

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Untersuchungen zur Prävalenz und zum Nachweis
von Antikörpern gegen feline Panleukopenieviren

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Katherina Mende (geb. Habekost)
aus Hamburg

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.- Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	8
II.	LITERATURÜBERSICHT: FELINE PANLEUKOPENIE	9
1.	Ätiologie	9
1.1.	Taxonomie	9
1.2.	Morphologie.....	10
1.2.1.	Virusgenom.....	10
1.2.2.	Virusproteine	10
2.	Epidemiologie	12
2.1.	Empfängliche Spezies.....	12
2.2.	Infektion und Übertragung.....	13
2.3.	Prävalenz der Infektion	14
3.	Immunantwort	16
3.1.	Angeborene Immunität	16
3.2.	Erworbene Immunität	17
3.2.1.	Bildung von Antikörpern nach Impfung oder Infektion.....	17
3.2.2.	Maternale Antikörper.....	19
3.2.3.	Untersuchung auf Antikörper	21
3.2.3.1.	Hämagglutinationshemmtest	23
3.2.3.2.	Serumneutralisationstest	23
3.2.3.3.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.....	24
3.2.3.4.	Indirekter Immunofluoreszenztest	24
3.2.3.5.	Schnelltests	24
3.2.4.	Antikörperprävalenz	25
4.	Prävention.....	27
4.1.	Aktive Immunisierung	27
4.1.1.	Verfügbare Impfstoffe	29
4.1.1.1.	Modifizierte Lebendvakzinen	30
4.1.1.2.	Inaktivierte Impfstoffe	32
4.1.2.	Leitlinien zur Impfung	33
4.1.3.	Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes.....	37
4.1.4.	Impfversager und Impfdurchbrüche	39

4.2.	Passive Immunisierung	40
III.	STUDIE 1	43
IV.	STUDIE 2	49
V.	DISKUSSION	56
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	67
VII.	SUMMARY	69
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	71
IX.	DANKSAGUNG	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
AAFP	American Association of Feline Practitioners
ABCD	Advisory Board on Cat Diseases
BPT	Bundesverband Praktizierender Tierärzte e. V.
CDV	canine distemper virus (canines Staupevirus)
CPV	canines Parvovirus
CRF	chronic renal failure (chronisches Nierenversagen)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FeLV	felines Leukämievirus
FISS	feline injection site sarcoma (felines impfassoziertes Sarkom)
FIV	felines Immunschwächevirus
FPV	felines Panleukopenievirus
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HAH	Hämagglutinationshemmtest
i. p.	intraperitoneal
IFA	immunofluorescence assay (Immunfluoreszenztest)
IgG	Immunglobulin-G
IgM	Immunglobulin-M
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
MDA	maternally derived antibodies (maternale Antikörper)
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder
ml	Milliliter
MLV	modifizierte Lebendvakzine
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NF-κB	nuclear factor-kappa B (nukleärer Faktor-Kappa B)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NPV	negative predictive value (negativer prädiktiver Wert)

NS	non structural protein (Nichtstrukturprotein)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PPV	positive predictive value (positiver prädiktiver Wert)
s. c.	subkutan
SNT	Serumneutralisationstest
SPF	specific pathogen-free (spezifisch-pathogen-frei)
StIKo Vet.	Ständige Impfkommision Veterinär
TCO	tissue-culture-origin
u. a.	unter anderem
VGG	Vaccine Guidelines Group
VP	viral protein (virales Protein, Strukturprotein)
VPC	Veterinary Products Committee
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Das feline Panleukopenievirus (FPV) ist ein weltweit bei Katzen allen Alters vorkommendes Parvovirus und Erreger der feline Panleukopenie. Insbesondere aufgrund der Schwere der Erkrankung, welche durch gastrointestinale Symptome und Blutbildveränderungen geprägt ist, sollte entsprechend nationaler und internationaler Leitlinien jede Katze zu jedem Zeitpunkt über einen ausreichenden Immunschutz, entweder infolge einer natürlichen Infektion oder einer Impfung gegen FPV, verfügen (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013).

Trotz dieser Empfehlungen kommt es regelmäßig zu Ausbrüchen feline Panleukopenie. Es ist unklar, wie gut die Population in Deutschland vor Infektionen mit FPV geschützt ist. Weiterhin ist nicht bekannt, ob es Katzen innerhalb der Population gibt, die besonders infektionsgefährdet sind. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass manche Katzen nicht adäquat auf die Impfung reagieren (JAKEL et al., 2012). Auch wurden dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) ab 2008 gehäuft Fälle von feline Panleukopenie in Norwegischen-Waldkatzen-Zuchten gemeldet (HOFFMANN et al., 2010).

Zur Bestimmung des Immunstatus und damit der Notwendigkeit einer Impfung steht die Messung von Antikörpern zur Verfügung (TIZARD & NI, 1998; LAPPIN et al., 2002). Für ihre Etablierung in der Praxis im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks wäre ein zuverlässiger Schnelltest wünschenswert.

Das erste Ziel dieser Arbeit (Studie 1) war daher die Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen FPV bei Katzen in Süddeutschland. Im Rahmen dieser ersten Studie sollte zudem untersucht werden, ob es Faktoren, insbesondere im Signalement, in den Haltungsformen, im Gesundheitsstatus oder Impfstatus gibt, die mit dem Fehlen von Antikörpern assoziiert sind. Das zweite Ziel dieser Arbeit (Studie 2) war die Evaluation eines Schnelltests zur Bestimmung von Antikörpern gegen FPV für den Einsatz in der Praxis. Unter der Verwendung des Hämagglutinationshemmtests (HAH) als Goldstandard wurden Sensitivität, Spezifität, positiver (PPV) und negativer prädiktiver Wert (NPV) sowie die Praktikabilität untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT: FELINE PANLEUKOPENIE

1. Ätiologie

FPV wurde 1928 das erste Mal in Frankreich isoliert (VERGE & CRISOFORONI, 1928). Damals nur als „filtrierbarer Erreger“ identifiziert, wurde eine virale Ätiologie zunächst nur vermutet. Auch wenn die feline Panleukopenie bereits seit über 100 Jahren diagnostiziert wird (MURPHY et al., 1999), so konnte erst viele Jahre später gezeigt werden, dass viele Erkrankungen mit gastrointestinalen und hämatologischen Symptomen tatsächlich auf eine Infektion mit einem einzigen Virus, dem FPV, zurückzuführen sind (HAMMON & ENDERS, 1939).

1.1. Taxonomie

Die Familie der Parvoviridae umfasst die zwei Subfamilien, Parvovirinae und Densovirinae. Während die Vertreter der Densovirinae Insekten infizieren, umfasst die Subfamilie der Parvovirinae Viren, die Wirbeltiere infizieren. Die Subfamilie der Parvovirinae wird in die fünf Gattungen Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus, Amdovirus und Bocavirus unterteilt. Mitglieder der Gattung Parvovirus replizieren autonom und sind grundsätzlich wirtsspezifisch (KING et al., 2011).

Aus dem FPV entwickelte sich das canine Parvovirus Typ 2 (CPV-2) (TRUYEN, 1999), das 1978 und in den Jahren danach in vielen Ländern gefunden wurde (APPEL et al., 1979; BLACK et al., 1979; CARMICHAEL et al., 1980; WALKER et al., 1980; CARMICHAEL & BINN, 1981; CARMICHAEL, 2005). Das CPV-2 ist seitdem mehrfach mutiert und hat seine genetischen und antigenetischen Eigenschaften verändert (PARRISH et al., 1985; PARRISH et al., 1988a; SENDA et al., 1988). Es wurde schließlich durch die neuen Varianten CPV-2a und CPV-2b verdrängt und wird seitdem in der Hundepopulation praktisch nicht mehr nachgewiesen (PARRISH et al., 1991; PARRISH, 1994; TRUYEN et al., 1996b; CLEGG et al., 2011). Im Jahr 2000 wurde eine weitere Variante, das CVP-2c, entdeckt (BUONAVOGLIA et al., 2001). Auch diese Variante breitete sich schnell in der Hundepopulation aus (MARTELLA et al., 2004; NAKAMURA et al., 2004; DECARO et al., 2005; DECARO et al., 2006b;

DECARO et al., 2006c; DECARO et al., 2007a; PEREZ et al., 2007; CALDERON et al., 2009; NANDI et al., 2010). Diese neuen CPV-Varianten 2a, 2b und 2c kommen derzeit weltweit in unterschiedlichen Häufigkeiten vor (DE YBANEZ et al., 1995; GREENWOOD et al., 1995; SAGAZIO et al., 1998; PEREIRA et al., 2000; WANG et al., 2005; DECARO et al., 2007a; DECARO et al., 2009; HOELZER & PARRISH, 2010; CLEGG et al., 2011). So wurden in den USA die Varianten CPV-2a bei etwa 20 % und CPV-2b bei etwa 80 % aller Hunde (PARRISH et al., 1991) und in Deutschland CPV-2a bei etwa 70 % und CPV-2b bei etwa 30 % aller Hunde nachgewiesen (TRUYEN et al., 1996a).

Anders als das CPV ist das FPV genetisch sehr stabil. Mutationen und antigenetische Variationen sind selten (PARRISH & CARMICHAEL, 1983; MOCHIZUKI et al., 1989; MOCHIZUKI et al., 1993; MOCHIZUKI et al., 1996; DECARO et al., 2008b).

1.2. Morphologie

Die Parvoviren gehören zu den kleinsten überhaupt vorkommenden Viren. Die unbehüllten FPV-Partikel haben einen Durchmesser von etwa 21 bis 24 nm (JOHNSON et al., 1974). Ihre Kapside werden durch 60 Kapsomere gebildet und haben eine icosahedrale Symmetrie (TSAO et al., 1991).

1.2.1. Virusgenom

Die Viruspartikel enthalten ein einzelsträngiges, lineares Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Genom mit einem Molekulargewicht von 1,5 bis 2,0 x 10⁶ Dalton, welches zum Großteil komplementär zu der während einer Infektion produzierten Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) vorliegt (SIEGL et al., 1985). Es gibt zwei offene Leserahmen mit jeweils eigenen Promotoren, die zum einen für die Strukturproteine (VP) und zum anderen für die Nichtstrukturproteine (NS) codieren (COTMORE & TATTERSALL, 1987; REED et al., 1988).

1.2.2. Virusproteine

Die Kapsomere werden zu etwa 5 % aus dem VP1 mit einem Molekulargewicht von 83 bis 86 Kilodalton (kDa) und zu etwa 95 % aus dem VP2 mit einem Molekulargewicht von 64 bis 66 kDa gebildet (COTMORE & TATTERSALL, 1987). Ein drittes Strukturprotein VP3 ist nur bei einigen Parvoviren ausgebildet (MODROW et al., 2010). Die Strukturproteine VP1 und VP2 bestimmen die

Wirtsspezifität des Virus, wobei nur wenige Aminosäuren für die entscheidenden genetischen und antigenetischen Eigenschaften verantwortlich sind (PARRISH, 1991; CHANG et al., 1992; TRUYEN et al., 1994; TRUYEN et al., 1995; TRUYEN et al., 1996a). Vor allem Aminosäuresubstitutionen im VP2 führen zu einer Veränderung der Kapsidstruktur und beeinflussen somit die Bindungsfähigkeit an spezifische feline und canine Transferrin-Rezeptoren (GOVINDASAMY et al., 2003). Diese spezifische Bindung führt schließlich zu Unterschieden in der Wirtsspezifität von feline und canine Parvoviren (HUEFFER et al., 2003; PALERMO et al., 2006). Für das feline und canine Wirtsspektrum sind so jeweils drei Aminosäurepositionen verantwortlich. Bei FPV sind es die Aminosäuren 80, 564 und 568 (TRUYEN et al., 1994; TRUYEN et al., 1996a), bei CPV die Aminosäuren 93, 323 (CHANG et al., 1992; HUEFFER et al., 2003) und 300 (PARKER & PARRISH, 1997). Die CPV-Varianten 2a, 2b und 2c unterscheiden sich untereinander jeweils in nur einer Aminosäuresubstitution an der Position 426 (PARRISH et al., 1991; BUONAVOGLIA et al., 2001). Außerdem beeinflussen Unterschiede im VP2 die Fähigkeit zur Hämagglutination (PARRISH et al., 1988b).

Große Teile der Kapsidoberfläche werden durch neutralisierende Antikörper erkannt. Elektronenmikroskopische Studien mit monoklonalen Antikörpern zur antigenetischen Struktur von FPV und CPV haben gezeigt, dass die Kapsidoberfläche sowohl CPV-spezifische, als auch FPV-spezifische Epitope aufweist, welche wiederum mit verschiedenen Gruppen von gemeinsamen Epitopen überlappen (PARRISH & CARMICHAEL, 1983; HAFENSTEIN et al., 2009). Auch wenn FPV und die verschiedenen CPV-Varianten aufgrund ihrer antigenetischen Ähnlichkeit im HAH nicht mittels polyklonaler Seren unterscheidbar sind (FLOWER et al., 1980; LENGHAUS & STUDDERT, 1980; SENDA et al., 1988), so ist mittels monoklonaler Antikörper doch eine Differenzierung möglich (PARRISH et al., 1985; PARRISH et al., 1988a; PARRISH et al., 1991). Inzwischen ist auch eine Typisierung der verschiedenen CPV-Varianten mittels Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR), basierend auf Minor Groove Binder (MGB) Technologie, möglich (DECARO et al., 2006b). Diese ermöglicht auch eine Unterscheidung zwischen Feldvirus und Impfvirus (DECARO et al., 2006a). Im Gegensatz zu CPV hat FPV nur einen

Serotyp. Dies zeigten Untersuchungen mit verschiedenen Isolaten von FPV und ihren Antiseren (SCOTT, 1968).

Bei den tierpathogenen Parvoviren gibt es zwei Nichtstrukturproteine, das NS1 und das NS2. Die Hauptfunktionen der hier codierten Proteine liegen in der Vermehrung und Infektiosität der Viren (MODROW et al., 2010).

2. Epidemiologie

Die feline Panleukopenie kommt in allen Teilen der Welt und bei allen Mitgliedern der Familie der Felidae vor (COCKBURN, 1947; BARKER et al., 1983; SCOTT, 1987). Auch wenn Katzen allen Alters erkranken können, so ist die feline Panleukopenie vor allem eine Jungtierkrankheit (KRUSE et al., 2011).

2.1. Empfängliche Spezies

Die Hauskatze ist unter den Mitgliedern der Familie der Felidae die am häufigsten mit FPV infizierte Spezies. Der Hund kann zwar experimentell mit FPV infiziert werden, danach repliziert das Virus jedoch nur im Thymus und im Knochenmark, und es kommt nicht zur Ausscheidung (TRUYEN & PARRISH, 1992). Infektionen mit FPV kommen auch bei Wildkatzen vor (STEINEL et al., 2001). Bereits 1947 wurde von Todesfällen unter Tigern (*Panthera tigris*), Geparden (*Acinonyx jubatus*), Ozelots (*Leopardus pardalis*), Buschkatzen (*Leptailurus serval*), Luchsen (*Lynx lynx*) und Leoparden (*Panthera pardus*) im Londoner Zoo berichtet (COCKBURN, 1947). Auch Mitglieder der Familie der Procyonidae (Kleinbären), wie der Waschbär (BARKER et al., 1983), der Nasenbär, das Katzenfrett (GILLESPIE & SCOTT, 1973) und der amerikanische Nerz (Mink) als Mitglied der Mustelidae (Marder) (BARKER et al., 1983; PARRISH et al., 1987), gehören zu den empfänglichen Spezies einer FPV-Infektion.

Die genetischen und antigenetischen Veränderungen von CPV-2 ermöglichten den neuen CPV-Varianten 2a, 2b und 2c auch an den feline Transferrin-Rezeptor zu binden (HUEFFER & PARRISH, 2003). Dadurch können die Viren Katzen infizieren (IKEDA et al., 2002; HUEFFER & PARRISH, 2003) und sehr effektiv in ihnen replizieren (TRUYEN et al., 1994; TRUYEN et al., 1996a). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Katzen im Feld mit den neuen CPV-Varianten infiziert werden können und vergleichbare Symptome einer feline Panleukopenie entwickeln (MOCHIZUKI et al., 1993; MOCHIZUKI et al., 1996;

TRUYEN et al., 1996b; IKEDA et al., 2000; BATTILANI et al., 2006; DECARO et al., 2010; BATTILANI et al., 2011; DECARO et al., 2011). Diese Beobachtungen im Feld decken sich mit experimentellen Studien zur Infektion von CPV-Varianten bei Katzen (CHALMERS et al., 1999; NAKAMURA et al., 2001b; GAMOH et al., 2003; GAMOH et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CPV-Varianten auch über mehrere Wochen von symptomlosen Katzen ausgeschieden werden können (CLEGG et al., 2012). In Deutschland konnten in einer älteren Studie bei etwa 10 % der Katzen mit einer Parvovirusinfektion die Subtypen CPV-2a und CPV-2b nachgewiesen werden (TRUYEN et al., 1996b).

Auch Co-Infektionen mit mehreren Parvoviren kommen bei Hunden und Katzen vor. So wurden bereits bei einer Katze gleichzeitig mehrere CPV-Varianten (BATTILANI et al., 2006) sowie gleichzeitig CPV-Varianten und FPV nachgewiesen (URL et al., 2003; OHSHIMA & MOCHIZUKI, 2009; BATTILANI et al., 2011). Bei Hunden können Co-Infektionen von mehreren CPV-Varianten (BATTILANI et al., 2007) und von CPV-Feld- und -Impfstämmen vorkommen (DECARO et al., 2007b; MOCHIZUKI et al., 2008).

2.2. Infektion und Übertragung

Eine systemische Infektion mit FPV kann durch direkten oder indirekten Kontakt über den intranasalen oder oralen Weg erfolgen (CSIZA et al., 1971b). Die direkte Übertragung erfolgt durch infizierte Tiere, die sich in einem frühen Erkrankungsstadium befinden und hohe Virusmengen über Kot, Urin, Augen- oder Nasenausfluss, Speichel und Erbrochenes ausscheiden (GILLESPIE & SCOTT, 1973). Auch wenn während der Erkrankung sehr große Mengen ausgeschieden werden (TRUYEN et al., 2009), so genügt bereits die Aufnahme geringer Mengen von 10^2 bis 10^3 Viren für eine Infektion (MODROW et al., 2010). Eine indirekte Übertragung kann über Keimträger, wie Futter, Schlafplätze, Käfige, Hände oder Kleidung, erfolgen. Es wird vermutet, dass auch verschiedene Insekten, wie zum Beispiel (z. B.) Flöhe, FPV übertragen können (GILLESPIE & SCOTT, 1973). Der hohe Anteil an Wohnungskatzen, die an feline Panleukopenie erkranken, zeigt, dass die indirekte Übertragung von großer Bedeutung ist. So waren in einer aktuellen Studie in Deutschland 62,5 % der Katzen, die aufgrund einer feline Panleukopenie in einer Klinik behandelt wurden, Wohnungskatzen. Vorberichtlich hatten sogar 14,5 % der Katzen keinen

Kontakt zu anderen Katzen (KRUSE et al., 2010). Das Virus kann auch transplazentar vom Muttertier auf den Fetus übertragen werden (CSIZA et al., 1971a; GILLESPIE & SCOTT, 1973).

Auch wenn die Virusausscheidung meist nur ein bis zwei Tage dauert, können FPV und CPV-Varianten bis zu sechs Wochen nach einer Infektion im Urin und Kot von Katzen nachgewiesen werden (CSIZA et al., 1971a, 1971b; CHALMERS et al., 1999; GREENE & ADDIE, 2006; CLEGG et al., 2012). Damit stellen Katzen eine lang andauernde Infektionsquelle für andere Katzen und auch für Hunde, falls sie mit CPV-Varianten infiziert sind, dar (CLEGG et al., 2012).

Parvoviren sind aufgrund ihrer Morphologie sehr stabil gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen und können in kontaminierten Umgebungen über Wochen bis zu einem Jahr infektiös bleiben (MACPHERSON, 1956; POOLE, 1972; UTTENTHAL et al., 1999). Eine Inaktivierung ist nur unter anderem (u. a.) mit Formalin (0,2 %) (JOHNSON, 1966), Peressigsäure, Formaldehyd, Natriumhypochlorit oder Natriumhydroxid möglich (KÖHLER et al., 2009). Aufgrund seiner hohen Kontagiosität und Stabilität kann sich das Virus schnell ausbreiten (FROMONT et al., 1996).

2.3. Prävalenz der Infektion

Zur Häufigkeit der feline Panleukopenie gibt es derzeit nur wenige gesicherte Zahlen (TRUYEN et al., 2009; TRUYEN, 2010). Auch die Bedeutung von CPV-Varianten bei Katzen ist nur unzureichend bekannt (HOELZER & PARRISH, 2010). Dennoch meinen praktizierende Tierärzte in den letzten zwei Jahrzehnten einen Rückgang der Prävalenz der feline Panleukopenie beobachtet zu haben (GREENE & ADDIE, 2006). Als Gründe für den Rückgang werden eine Zunahme an Impfungen und die Verwendung von effizienteren modifizierten Lebendvakzinen (MLV) vermutet (GREENE & ADDIE, 2006).

Zur Bestimmung der Prävalenz dient der direkte Erregernachweis mittels PCR aus Gewebe oder Kot, oder mittels Antigennachweis aus Kot. Da sich die Untersuchungen jedoch meist auf symptomatische Tiere beschränken und die Tiere auch inapparent infiziert sein können, ist die tatsächliche Prävalenz von FPV und CPV-Varianten nur schwer abzuschätzen. In einer Studie aus England, in der 274 Einsendungen (ganze Tiere und Gewebeproben), die größtenteils aus Katzenzuchten und Tierheimen stammten, histopathologisch untersucht wurden,

war die feline Panleukopenie mit 25 % die häufigste Todesursache bei Welpen (CAVE et al., 2002). Die meisten klinischen Tests zum Erregernachweis aus Ausscheidungen unterscheiden nicht zwischen FPV und CPV-Varianten (NEUERER et al., 2008). Zudem kann Impfvirus noch bis zu drei Wochen nach einer Impfung mittels PCR oder enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) im Kot nachgewiesen werden und zu positiven Ergebnissen führen (PATTERSON et al., 2007; NEUERER et al., 2008). Dabei zeigen verschiedene Testsysteme zum Antigennachweis deutliche Sensitivitäts-Unterschiede (PATTERSON et al., 2007).

Die Inzidenz der feline Panleukopenie kann in Abhängigkeit von der Enge des Zusammenlebens der Tiere in einer Population erheblich variieren (GILLESPIE & SCOTT, 1973; HELLARD et al., 2011) und ist unter beengten Verhältnissen besonders hoch (POLLOCK & POSTORINO, 1994; GOLDSTEIN, 2005; RICHARDS et al., 2006). Dabei sind Katzen in Umgebungen mit einer hohen Anzahl von ungeschützten Tieren, wie Katzenzuchten, Tierheime und Auffangstationen, besonders stark gefährdet (GILLESPIE & SCOTT, 1973; ADDIE et al., 1998; CAVE et al., 2002). So wurde z. B. bei Welpen aus Tierheimen *post mortem* signifikant häufiger eine feline Panleukopenie als Todesursache diagnostiziert als bei Welpen aus Privathaushalten (CAVE et al., 2002).

Neben der Enge des Zusammenlebens ist das Alter der Katzen ein weiterer wichtiger Risikofaktor. Auch wenn ältere Tiere erkranken können, so sind Jungtiere doch signifikant häufiger von der feline Panleukopenie betroffen (KRUSE et al., 2010, 2011). Als mögliche Erklärungen werden insbesondere eine unzureichende Impfung, fehlende natürliche Exposition oder fehlende Boosterung durch inapparente Infektionen erwogen (KRUSE et al., 2010).

Das Auftreten der feline Panleukopenie folgt einem saisonalen Muster (REIF, 1976). Eine deutliche Häufung der Erkrankung findet in Abhängigkeit von geographischen und damit klimatischen Bedingungen in den Sommer- bis Herbstmonaten, teilweise auch noch im Dezember statt (RISER, 1943; BENTICK-SMITH, 1949; CELLO, 1971; GILLESPIE & SCOTT, 1973; REIF, 1976). Katzen sind saisonal polyöstrische Tiere mit einer Häufung der Geburten im Frühjahr. Mit einem graduellen Abfall der maternalen Antikörpern (MDA) kommt es etwa zwölf bis 16 Wochen nach der Geburt zu einer steigenden Anzahl

von ungeschützten, empfänglichen Welpen und damit zu einer Häufung der Erkrankung (SCOTT, 1971). Dieses Phänomen ist auch in Populationen mit hohem Anteil von Wohnungskatzen zu beobachten und somit nicht nur auf eine eventuelle Zunahme von direkten Tierkontakten im Spätsommer zurückzuführen (REIF, 1976).

Beim Hund wird eine Rasseprädisposition für die canine Parvovirose beschrieben. So weist eine Studie darauf hin, dass die Rassen Dobermann und Rottweiler häufiger erkranken als andere Rassen (GLICKMAN et al., 1985). Dagegen wurde die Rasse als Risikofaktor für die feline Panleukopenie in entsprechenden Studien zu Prävalenz und Verlauf bislang nicht festgestellt (CAVE et al., 2002; KRUSE et al., 2010, 2011; DIGANGI et al., 2012a).

3. Immunantwort

Die Immunantwort immunologisch naiver Tiere wird nach dem ersten Kontakt mit dem Parvovirus-Antigen zunächst durch Bestandteile des angeborenen Immunsystems bestimmt. Die Aufnahme des Virus in die Zellen ermöglicht schließlich die Aktivierung des erworbenen Immunsystems, so dass die immunologische Reaktion bei einem erneutem Kontakt mit dem Antigen (Feldvirus oder Impfvirus) hauptsächlich durch bereits gebildete Antikörper und zytotoxische T-Zellen bestimmt wird (TIZARD, 2012a, 2012b).

3.1. Angeborene Immunität

Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören insbesondere die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (BIRON et al., 1999), die Granulozyten, die Makrophagen und die dendritischen Zellen in der Haut und Schleimhaut (STEINMAN & COHN, 1973; STEINMAN, 1991; GEISSMANN et al., 2010; GALLI et al., 2011). Die NK-Zellen erkennen und töten infizierte Zellen, die dendritischen Zellen nehmen Pathogene auf und präsentieren sie im nächsten Lymphknoten den T-Zellen (TIZARD, 2012f). Weiterhin gehören zum angeborenen Immunsystem verschiedene humorale Faktoren wie das Komplementsystem und die Interleukine. Können die eingedrungenen Parvoviren nicht direkt nach einer erfolgten Infektion eliminiert werden, bewirken Makrophagen und dendritische Zellen die Aktivierung der erworbenen Immunantwort (RICHARDS et al., 2006; VAHLENKAMP, 2010; TIZARD, 2012f).

3.2. Erworbene Immunität

Das erworbene Immunsystem setzt sich ebenfalls aus zellulären und humoralen Faktoren zusammen. Zum Zeitpunkt der Geburt ist es vollständig angelegt (TIZARD, 2012c). Bereits ab dem 42. Tag nach der Konzeption können B-Zellen in der fetalen Leber nachgewiesen werden (KLOTZ et al., 1985). Zudem kann über das Kolostrum, welches reich an Lymphozyten ist, bereits direkt nach der Geburt zelluläre Immunität auf das Neugeborene übertragen werden (TIZARD, 2012c). Die endgültige Entwicklung ist jedoch von der Stimulation durch Antigene abhängig und dauert noch mehrere Wochen (DAY, 2007). In dieser Zeit ist für die Welpen der Schutz vor Pathogenen einerseits durch das angeborene Immunsystem und andererseits durch MDA essentiell (SCOTT et al., 1970c; TIZARD, 2012c). Danach werden systemische Virusinfektionen, wie die feline Panleukopenie, hauptsächlich durch Antikörper vom Immunglobulin-G (IgG) -Isotyp und durch zirkulierende zytotoxische T-Zellen kontrolliert (TIZARD, 2012a, 2012b).

3.2.1. Bildung von Antikörpern nach Impfung oder Infektion

Antikörper gegen FPV können nach Erstkontakt mit dem Virus ab dem sechsten bis achten Tag nach einer Infektion und damit etwa drei Tage nach Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden (SCOTT et al., 1970c; CSIZA et al., 1971b). Bereits neugeborene Welpen sind gegenüber einer Infektion mit FPV kompetent und können in einem Alter von sieben bis zwölf Tagen auf einen Antigenkontakt mit der Bildung von Antikörpern reagieren (GREENE & ADDIE, 2006). Die höchsten Antikörpertiter werden bei Tieren nach einer natürlichen Infektion beobachtet (SCOTT et al., 1970b; DECARO et al., 2008a; TRUYEN et al., 2009). Nach einer Impfung fallen die Antikörpertiter häufig niedriger aus und erreichen nur selten ähnlich hohe Werte wie nach einer natürlichen Infektion (GREENE & ADDIE, 2006).

Nach der Antigenpräsentation in den Lymphknoten durch antigenpräsentierende Makrophagen und dendritische Zellen kommt es zur Aktivierung von B-Zellen und deren anschließende Ausdifferenzierung zu Antikörper-bildenden Plasmazellen. Zunächst werden Antikörper vom Immunglobulin-M (IgM) -Isotyp gebildet. Es folgen ein Wechsel zum IgG-Isotyp und die Affinitätsreifung durch somatische Mutation in den variablen Domänen der B-Zellen. Eine Restimulation dieser Zellen innerhalb von zwei bis vier Wochen im Rahmen

einer Grundimmunisierung (Impfung) bewirkt eine signifikante Steigerung der antigenspezifischen Gedächtniszellen. Gedächtniszellen ermöglichen bei weiteren Antigenkontakten eine schnelle und effektive Bildung von Antikörpern. Bei mangelhafter Grundimmunisierung kann unter Umständen die Ausbildung spezifischer Gedächtniszellen unterbleiben (VAHLENKAMP, 2010).

Neben kurzlebigen Plasmazellen entwickeln sich auch langlebige Plasmazellen, die über mehrere Jahre im Knochenmark persistieren und anhaltend Antikörper bilden (JANEWAY et al., 2001; TIZARD, 2012b). Ein Nachweis von Antikörpern gegen FPV ist somit auch immer ein Nachweis der anhaltenden Produktion von Antikörpern durch entsprechende langlebige Plasmazellen (SCHULTZ, 2006). Die Bildung von Antikörpern gilt damit als ein zuverlässiger Nachweis für die Entwicklung einer belastbaren Immunität gegen FPV (LAPPIN et al., 2002) und kann daher für das Monitoring des individuellen Immunstatus von Katzen genutzt werden (TIZARD & NI, 1998). Nicht in jedem Fall besteht jedoch eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Antikörpern und dem Schutz vor einer Infektion mit FPV. In einer Studie waren auch geimpfte Katzen, bei denen keine Antikörper nachweisbar waren, vor einer experimentellen Infektion geschützt (LAPPIN et al., 2002). Auch wenn die Antikörper bis auf ein nicht messbares Maß sinken, ist dies demnach nicht zwingend gleichbedeutend mit einer Empfänglichkeit, da der Schutz in diesem Fall über die zellvermittelte Immunität oder die schnelle Aktivierung von Gedächtniszellen aufrechterhalten werden kann (TIZARD & NI, 1998; LAPPIN et al., 2002).

Die erworbene Immunität gegenüber FPV nach einer natürlichen Infektion oder einer Impfung ist stabil und langanhaltend (SCOTT & GILLESPIE, 1971; GUEGUEN et al., 2000; GORE et al., 2006; TRUYEN et al., 2009) und ist im Wesentlichen von der Persistenz von Gedächtnis-B- und -T-Zellen sowie von der Persistenz von langlebigen Plasmazellen abhängig (JANEWAY et al., 2001; TIZARD, 2012b). Hohe Antikörpertiter gegen FPV sind bei einem Großteil der Katzen über mindestens drei bis vier Jahre nachweisbar (SCOTT & GEISSINGER, 1997; MOUZIN et al., 2004) und können sogar bis zu sechs Jahre auf einem gleichbleibend hohen Niveau bleiben (SCOTT & GEISSINGER, 1999). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Tiere auch mehr als sieben Jahre nach einer Impfung mit inaktivierten Impfstoffen noch vor einer Infektion mit FPV geschützt waren (SCOTT & GEISSINGER, 1999). Bei Hunden konnte

sogar gezeigt werden, dass Wiederholungsimpfungen gegen CPV bei bereits nachweisbarem Antikörpertiter keinen signifikanten weiteren Anstieg der Antikörper bewirkten (HOGENESCH et al., 2004) und dass Hunde, die mindestens eine Wiederholungsimpfung während ihres Lebens bekommen hatten, keine größere Wahrscheinlichkeit hatten, Antikörper gegen CPV zu haben als Hunde, die lediglich grundimmunisiert wurden (TENNANT et al., 1991; BOEHM et al., 2004).

Um den Schutz einer Katze vor einer Infektion durch Pathogene hervorzusagen, gibt es, abgesehen von der Bestimmung von Antikörpern, kaum Alternativen (SAALMULLER, 2006). Die Quantifizierung der zellulären Immunität gegen FPV ist schwierig und wird routinemäßig nicht durchgeführt (LAPPIN et al., 2002). Können keine Antikörper nachgewiesen werden, sollte zumindest angenommen werden, dass das Tier ungeschützt ist (LAPPIN et al., 2002).

3.2.2. Maternale Antikörper

Durch die Aufnahme von Kolostrum direkt nach der Geburt erhalten die Nachkommen von immunkompetenten Muttertieren einen passiven Schutz gegenüber FPV, die MDA (SCOTT et al., 1970c; CLAUS et al., 2006). Nur ein ganz geringer Teil dieser IgG-Antikörper wird bereits vor der Geburt über die Plazenta vom endotheliochondrialen Typ auf die Feten übertragen (SCOTT et al., 1970c; TRUYEN et al., 2009). Bei guter Kolostrumaufnahme kann der Antikörpertiter der Welpen innerhalb von 24 Stunden auf Werte ansteigen, die mit dem Antikörpertiter des Muttertiers vergleichbar sind (SCOTT et al., 1970c). Die Höhe des MDA-Titers ist damit in erster Line vom Antikörpertiter der Mutter abhängig (JAKEL et al., 2012). Muttertiere mit besonders hohen Antikörpertitern sind z. B. Tiere, die eine feline Panleukopenie überstanden haben, die in einer Umgebung mit hohem Infektionsdruck leben oder Tiere, die kurz vor oder während der Trächtigkeit noch eine Impfung erhalten haben (TRUYEN et al., 2009). Weiterhin wird die Höhe des MDA-Titers durch die Qualität des Kolostrums, die adäquate Kolostrumaufnahme (Menge und Zeitpunkt) und eine gute Absorption über den Gastrointestinaltrakt beeinflusst (CLAUS et al., 2006; TIZARD, 2012c). Zwei Studien bei Katzen und Hunden konnten zeigen, dass es zwischen Wurfgeschwistern zu großen Abweichungen kommen kann (CASSELEUX & FONTAINE, 2006; POULET, 2007). Andere Studien fanden hingegen sehr ähnliche MDA-Titer innerhalb eines Wurfes, sowohl bei Katzen

(JAKEL et al., 2012), als auch bei Hunden (FRIEDRICH & TRUYEN, 2000). Bereits 24 Stunden nach der Geburt kommt es zu einem graduellen Abfall der MDA mit einer Halbwertszeit von etwa 8,8 (JAKEL et al., 2012) bis 9,5 Tagen (SCOTT et al., 1970c).

In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass hohe MDA-Titer zum Teil noch viele Wochen nach der Geburt bei Katzen und Hunden nachweisbar sind (SCOTT et al., 1970c; ADDIE et al., 1998; DAWSON et al., 2001; GORE et al., 2006; RICHARDS et al., 2006; POULET, 2007; REESE et al., 2008; TRUYEN et al., 2009). Eine aktuelle Studie zeigte, dass zum Zeitpunkt der ersten Impfung mit acht Wochen 92 % der Katzenwelpen noch MDA gegen FPV hatten. Diese MDA waren bei manchen Welpen sogar bis zur 20. Lebenswoche nachweisbar (JAKEL et al., 2012). Welpen, die MDA haben, sind solange vor einer Infektion geschützt, bis die Antikörpertiter auf ein bestimmtes Level abfallen (SCOTT et al., 1970c; JAKEL et al., 2012). SCOTT und Mitarbeiter (1970c) ermittelten in Infektionsexperimenten an Welpen, dass Antikörpertiter im SNT (Serumneutralisationstest) $\geq 1:30$ vor feline Panleukopenie schützen. Die MDA interferieren mit dem Aufbau einer aktiven Immunität nach einer Impfung mit inaktivierten Impfstoffen und MLV (FASTIER, 1968; O'REILLY et al., 1969; SCOTT et al., 1970c; DAWSON et al., 2001; TRUYEN et al., 2009; JAKEL et al., 2012). Dabei können bereits niedrige MDA-Titer unterhalb der Nachweisgrenze (im HAH und SNT) die Bildung von Antikörpern nach einer Impfung verhindern (SCOTT et al., 1970c; JAKEL et al., 2012). Während dieser kritischen Phase, in der die MDA mit der Impfung interferieren und den Aufbau einer aktiven Immunität verhindern, jedoch nicht mehr vor einer Infektion schützen, wird eine hohe Inzidenz von Fällen schwerer feline Panleukopenie beobachtet (GILLESPIE & SCOTT, 1973; HORLACHER et al., 2002). MDA können die aktive Bildung von Antikörpern sogar noch nach mehrfachen Impfungen verhindern. In einer Studie hatten 37 % von in der achten, zwölften und 16. Lebenswoche geimpften Katzenwelpen danach keine aktiv gebildeten Antikörper (JAKEL et al., 2012). Nach einer zweifachen Impfung in der achten und zwölften Lebenswoche, wie sie von den meisten Impfstoffherstellern empfohlen wird, reagierten sogar nur 45 % der Welpen mit der aktiven Bildung von Antikörpern (JAKEL et al., 2012). Je höher dabei der Antikörpertiter der Mutter war, desto höher war auch der MDA-Titer und desto später erfolgt im

Rahmen einer Grundimmunisierung die aktive Bildung von Antikörpern (JAKEL et al., 2012). Ein Vergleich von MLV verschiedener Hersteller bezüglich ihrer Potenz, MDA zu überwinden, zeigte hier deutliche Unterschiede (JAKEL et al., 2012). Einer der getesteten Impfstoffe bewirkte bei mehreren Welpen keinen Antikörperanstieg, obwohl der MDA-Titer zum Zeitpunkt der Impfung sogar unterhalb der Nachweisgrenze lag (JAKEL et al., 2012). Grundsätzlich scheinen MLV MDA jedoch schneller zu überwinden als inaktivierte Impfstoffe. So waren in einer Studie Antikörpertiter von $\geq 1:40$ im HAH nach einer Impfung mit MLV bereits nach einer Woche und nach einer Impfung mit inaktivierten Impfstoffen erst nach zwei Wochen messbar (DIGANGI et al., 2012b). In älteren Studien konnte die Interferenz zwischen MDA und Impfvirus teilweise durch den Einsatz intranasaler Impfstoffe (BUONAVOGLIA et al., 1994; BUONAVOGLIA et al., 1995; MARTELLA et al., 2005) oder Hochdosis-Impfstoffe (BURTONBOY et al., 1991; BUONAVOGLIA et al., 1992; HOARE et al., 1997) überwunden werden.

MDA führen also zu einer selektiven Hemmung der Bildung von Antikörpern durch das Neugeborene (TIZARD, 2012f). Dabei werden verschiedene Mechanismen der Interferenz diskutiert; am wahrscheinlichsten ist, dass die MDA die Epitope der Antigene (und damit auch der Impfstoffe) maskieren und damit die Erkennung durch B-Zellen verhindern (TIZARD, 2012c).

3.2.3. Untersuchung auf Antikörper

Die Gründe für die Bestimmung von Antikörpern gegen FPV können vielfältig sein. Die Bestimmung ermöglicht die Feststellung des Schutzes vor feline Panleukopenie des Einzeltieres, der Fähigkeit, auf eine Impfung zu reagieren und der Effektivität einer Impfung, eine aktive Immunantwort hervorzurufen (TIZARD & NI, 1998; LAPPIN et al., 2002; SCHULTZ et al., 2002; DAY, 2012). Antikörperbestimmungen können auch zum Nachweis von MDA und zur Bestimmung oder Berechnung des optimalen Impfzeitpunktes eingesetzt werden (siehe II.4.1.3) (SCOTT et al., 1970c; FRIEDRICH & TRUYEN, 2000; JAKEL et al., 2012). Weiterhin können sie Hinweise auf eine eventuelle Exposition in der Vergangenheit geben (GREENE & ADDIE, 2006; GREENE & SCHULTZ, 2006). Das Bestimmen von Antikörpern gegen FPV wird auch beim Management von Ausbrüchen von feline Panleukopenie in Tierheimen oder Auffangstationen empfohlen (LARSON et al., 2009).

Ihre Bestimmung ist zur Diagnose einer feline Panleukopenie allerdings selten indiziert (GREENE & ADDIE, 2006). Im Falle einer akuten Erkrankung kann ein vierfacher Antikörperanstieg hinweisend sein (GREENE & ADDIE, 2006), eine zweifache Antikörper-Bestimmung wird aber selten durchgeführt, weil zur Diagnose bessere Tests verfügbar sind. Eine einmalige Antikörper-Bestimmung ist nicht geeignet, weil der Antigenkontakt aufgrund langer Persistenz der Antikörper mehrere Jahre zurück liegen kann (CSIZA et al., 1971a; SCOTT & GEISSINGER, 1999; MOUZIN et al., 2004). Da aber viele Katzen aufgrund von Impfungen Antikörper gegen FPV aufweisen und diese nicht von Antikörpern infolge einer Feldinfektion unterschieden werden können, kann der Nachweis von Antikörpern nur indirekt und unter Berücksichtigung der Impfhistorie einen Hinweis auf eine Infektion in der Vergangenheit geben. Auch kann nicht zwischen Antikörpern gegen FPV oder CPV-Varianten unterschieden werden (NAKAMURA et al., 2001a; BLANCO et al., 2009).

Die Konzentration an Antikörpern in einer Probe wird in Abhängigkeit vom verwendeten Messverfahren zumeist als Antikörpertiter angegeben. Dazu wird mit einer Reihe von Verdünnungen der Probe ein immunologischer Test durchgeführt. Der Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, bei der gerade noch eine positive Reaktion (z. B. Hämagglutination oder Neutralisation) im Test nachweisbar ist, ist der Antikörpertiter der Probe. Da für die verschiedenen Messmethoden jeweils keine internationalen Standards etabliert sind, sind die Ergebnisse verschiedener Methoden aus verschiedenen Labors nur eingeschränkt miteinander vergleichbar, und es kann zum Teil zu erheblichen Schwankungen zwischen den verschiedenen Labors kommen (LUFF et al., 1987; TIZARD & NI, 1998; JAKEL et al., 2012). Bei der Interpretation des Messergebnisses ist es von Bedeutung, das Alter und den Impfstatus des Tieres zu kennen. So zeigen z. B. Antikörper bei ausgewachsenen Tieren eine aktive Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Antigen an, Antikörper bei ungeimpften Welpen sind dagegen als MDA, also als passive Immunität, zu interpretieren (LAPPIN et al., 2002; JAKEL et al., 2012).

Der sogenannte Cut-off legt fest, welcher Antikörpertiter als positiv gilt und damit als schützend vor einer Infektion angesehen wird. Der Cut-off kann in Form von Infektionsexperimenten ermittelt werden. In verschiedenen Studien werden Antikörpertiter von $\geq 1:40$ im HAH als schützend vor einer Infektion

angenommen, sowohl für MDA, als auch für aktiv gebildete Antikörper (MOUZIN et al., 2004; PATTERSON et al., 2007; REESE et al., 2008; DIGANGI et al., 2011). Derzeit wird jedoch davon ausgegangen, dass bei geimpften Katzen jeglicher Nachweis, also auch niedrige Antikörpertiter von unter 1:40 im HAH mit dem Schutz vor einer Infektion assoziiert sind (LAPPIN, 2012; DAY, 2013); dies wurde auch in Infektionsexperimenten gezeigt (LAPPIN et al., 2002).

3.2.3.1. Hämagglutinationshemmtest

Der HAH nutzt die Eigenschaft von FPV, Schweineerythrozyten zu hämagglutinieren (GOTO et al., 1974; KONISHI et al., 1975). Die spezifische Bindung der im Serum befindlichen Antikörper an die im Test eingesetzten Parvoviren führt zu einer Hemmung ihrer Hämagglutination. Der HAH wird in den meisten Studien zur Bestimmung von Antikörpern gegen FPV eingesetzt und gilt aufgrund zahlreicher Vorteile als Goldstandard (LAPPIN et al., 2002; LAPPIN et al., 2009; DIGANGI et al., 2011; JAKEL et al., 2012; LAPPIN, 2012). Zwar ist der HAH etwas weniger sensitiv als der SNT, was insbesondere beim Nachweis niedriger Antikörpermengen von Bedeutung sein kann, liefert jedoch zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse (JOHNSON, 1971; GILLESPIE & SCOTT, 1973; NAKAMURA et al., 2001a; BLANCO et al., 2009; DIGANGI et al., 2012a; JAKEL et al., 2012). Zudem ist er schnell, mit einfachen technischen Mitteln und damit sehr kostengünstig durchzuführen (JOHNSON, 1971; GILLESPIE & SCOTT, 1973; LUFF et al., 1987). Die besten Ergebnisse der Adsorption von FPV an Schweineerythrozyten werden bei einer Inkubation bei 4 °C und einem pH-Wert von 6,8 erreicht (GOTO, 1975).

3.2.3.2. Serumneutralisationstest

Der SNT weist im Serum befindliche Antikörper nach, die infektiöse Partikel neutralisieren und somit eine Infektion verhindern. Die Infektiosität der nach der Bindung verbleibenden Testpartikel kann schließlich als zytopathischer Effekt sichtbar gemacht werden (SCOTT et al., 1970a). Der SNT wird, verglichen mit dem HAH, selten in wissenschaftlichen Studien eingesetzt. Im Vergleich zum HAH zeigte der SNT in verschiedenen Studien zwar eine höhere Sensitivität (JOHNSON, 1971; GILLESPIE & SCOTT, 1973; NAKAMURA et al., 2001a; JAKEL et al., 2012), hat jedoch aufgrund seines hohen Zeit-, Personal- und

Materialaufwands deutlich mehr Nachteile (MUELLER, 2005). Der SNT hat außerdem den Nachteil, dass es schwieriger ist, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (JOHNSON, 1971). Dies ist insbesondere der Fall, wenn keine hochsensible Zelllinie für den Test zur Verfügung steht, da der Endpunkt, der zytopathische Effekt, dann variabel ausfällt und schwieriger zu bestimmen ist (JOHNSON, 1971).

3.2.3.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der ELISA nutzt für den Nachweis von Antikörpern deren spezifische Bindung an FPV in Kombination mit einer enzymatischen Farbreaktion zur Sichtbarmachung der Bindung. Für den Test kann auch das in *E.scherichia coli* exprimierte VP2 des FPV verwendet werden (LAPPIN et al., 2002). In einer Studie zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV zeigte der ELISA im Vergleich mit dem HAH eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 75 % und zeichnete sich durch eine hohe Sensitivität, jedoch auch durch eine hohe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse aus (LAPPIN et al., 2002).

3.2.3.4. Indirekter Immunofluoreszenztest

Der indirekte Immunofluoreszenztest (IFA) nutzt, ähnlich wie der ELISA, die spezifische Bindung der zu bestimmenden Antikörper an FPV. Zur Sichtbarmachung der Bindung werden hier jedoch fluorochrommarkierte Antikörper verwendet. Die Reaktion wird unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (HOFMANN-LEHMANN et al., 1996). Die Qualität des Nachweises ist stark von der Qualität der verwendeten Antikörper abhängig. Der komplexe Ablauf und der hohe Geräteaufwand machen die Methode unpraktikabel (MUELLER, 2005).

3.2.3.5. Schnelltests

Alle verfügbaren Schnelltests zur Bestimmung von Antikörpern gegen FPV oder CPV-Varianten dienen der Bestimmung des Immunstatus des Patienten unter Praxisbedingungen. Damit können sie insbesondere zur Überprüfung einer aktiven Immunantwort nach den ersten Welpenimpfungen, im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks zur Untersuchung auf die Notwendigkeit einer Impfung oder auch zum Management von Krankheitsausbrüchen in Tierheimen oder Auffangstationen eingesetzt werden (DAY, 2012).

Für die Katze befindet sich der Schnelltest ImmunoComb® Feline VacciCheck (Biogal Laboratories, Kibbutz Galed, Israel) auf dem Markt. Dieser Schnelltest basiert auf einem ELISA-Prinzip. Zwischen einem Standard und dem Testserum wird die Menge an IgG-Antikörpern über einen Farbvergleich semiquantitativ bestimmt. Ein festgelegter Farbton entspricht einem Antikörpertiter von 1:80 im HAH. Dieser Antikörpertiter wird vom Hersteller als schützend vor einer Infektion interpretiert. Eine Studie, durchgeführt an Tierheimkatzen in Florida, ermittelte beim Vergleich der Ergebnisse mit dem HAH eine Sensitivität von 49 % und eine Spezifität von 99 % (DIGANGI et al., 2011). Nach einer Modifikation des Tests gibt der Hersteller nun eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 98 % an (BIOGAL GALED LABORATORIES, 2012).

Für den Hund befindet sich ein vergleichbarer Schnelltest, der ImmunoComb® Canine VacciCheck (Biogal Laboratories, Kibbutz Galed, Israel), zum Nachweis von Antikörpern gegen CPV-Varianten auf dem Markt (WANER et al., 2006). Der Test beruht auf dem gleichen Messprinzip wie der ImmunoComb® Feline VacciCheck. Dieser Test wurde auch für den Einsatz bei Katzen evaluiert, zeigte im Vergleich zum ImmunoComb® Feline VacciCheck jedoch eine deutlich niedrigere Sensitivität (28 %), Antikörpertiter unter 1:640 wurden nie als positiv erkannt (DIGANGI et al., 2011). Für den Hund sind zwei weitere Schnelltests erhältlich. Der TiterCHEK CDV/CPV (Synbiotics Corp., San Diego, CA), der ebenfalls auf einem ELISA Prinzip basiert, und der FASTest® CPV Ab (Megacor Diagnostik GmbH, Hörbranz, Österreich), der auf einem immunchromatographischen „Sandwich“ Prinzip basiert. Der zuletzt genannte Schnelltest wurde ebenfalls bei Katzen getestet, lieferte jedoch keine auswertbaren Ergebnisse (WILHELM et al., 2005).

3.2.4. Antikörperprävalenz

Viele Studien haben in der Vergangenheit die Prävalenz von Antikörpern gegen FPV bei Katzen untersucht und kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Eine Übersicht dieser Studien ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Studien zur Prävalenz von Antikörpern gegen das feline Panleukopenievirus (k. A.: keine Angabe, z. T.: zum Teil)

Studie/ Autoren	Ort	Population	Impfstatus	Antikörper- prävalenz in %	Anzahl der getesteten Katzen
(SCOTT, 1968)	New York, USA	unselektiert	ungeimpft	75	k. A.
(BLANCO et al., 2009)	Costa Rica	selektiert (Hauskatzen)	z. T. geimpft	93	97
(LEVY et al., 2008)	Isabela Island, Galapagos	unselektiert	ungeimpft	67	52
(LAPPIN et al., 2002)	Colorado, USA	selektiert (Proben zur Labor- untersuchung auf <i>Dirofilaria immitis</i>)	unbekannt	69	276
(HELLARD et al., 2011)	Frankreich	unselektiert (15 Populationen)	ungeimpft	25	469
(DIGANGI et al., 2012a)	Florida, USA	selektiert (Tierheim)	unbekannt	40	347

Zum einen wurden aus verschiedenen Ländern stark voneinander abweichende Antikörperprävalenzen berichtet. So konnten in einer frühen Studie bei 75 % der ungeimpften Katzen in Ithaca, New York, Antikörper nachgewiesen werden (SCOTT, 1968), auch wenn bei vielen dieser Tiere nie klinische Symptome einer feline Panleukopenie beobachtet wurden (GILLESPIE & SCOTT, 1973). In einer aktuellen Studie bei Hauskatzen in Costa Rica wurden bei 93 % der Katzen Antikörper nachgewiesen, dabei waren nur 18 % der Tiere vorher geimpft worden (BLANCO et al., 2009). Eine Studie auf den Galapagos zeigte, dass FPV in der dortigen Katzenpopulation endemisch auftritt. Die klinisch gesunden, ungeimpften Katzen wiesen zu 67 % Antikörper gegen FPV auf (LEVY et al., 2008). Die Autoren postulierten, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung subklinisch infiziert waren oder bereits eine Infektion überwunden hatten (LEVY et al., 2008). Bei Katzen in den USA mit unbekannter Impfhistorie wurde mit 69 % eine vergleichbare Antikörperprävalenz festgestellt (LAPPIN et al., 2002). In einer prospektiven Studie in 15 verschiedenen Katzenpopulationen von ungeimpften und unkastrierten Tieren in ländlichen Umgebungen in Frankreich wurden bei 25 % der Tiere Antikörper nachgewiesen (HELLARD et al., 2011). In einer Studienpopulation von Katzen, die in ein Tierheim in Florida aufgenommen wurden, betrug die Prävalenz von Antikörpern 40 % (DIGANGI et al., 2012a).

Zum anderen scheinen verschiedene Faktoren mit dem Nachweis von Antikörpern assoziiert zu sein. In der Studie aus Frankreich hatten Katzen, die einen Besitzer hatten, signifikant häufiger Antikörper als herrenlose Katzen. HELLARD und Mitarbeiter (2011) vermuteten hier, dass die herrenlosen Tiere einem vergleichsweise geringeren Infektionsdruck ausgesetzt waren. Auch das Alter der Tiere hatte in verschiedenen Studien Einfluss auf den Nachweis von Antikörpern gegen FPV. In der Studie aus Frankreich hatten ältere Katzen häufiger Antikörper als jüngere Tiere; es wurde hier ein kumulativer Effekt der lang persistierenden Antikörper vermutet (HELLARD et al., 2011). In der Tierheimstudie aus Florida hatten Katzen, die kastriert oder älter als sechs Monate waren, signifikant häufiger Antikörper (DIGANGI et al., 2012a). Ein Anstieg der Antikörperprävalenz mit zunehmenden Alter wurde auch in einer früheren Studie festgestellt (SCOTT & GEISSINGER, 1999). Im Gegensatz dazu hatten in der Studie aus Frankreich rote Katzen mit zunehmenden Alter seltener Antikörper als andere Katzen. Die Autoren führten dies auf die vermehrt auftretende Aggressivität roter Katzen und den damit reduzierten Kontakt von potentiell infektiösen Tieren zurück (HELLARD et al., 2011). Die Rasse scheint dagegen keinen Einfluss auf die Antikörperprävalenz zu haben. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zur Prävalenz von Antikörpern bei verschiedenen Katzenrassen konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen Norwegischen Waldkatzen und Europäisch-Kurzhaar-Katzen nachweisen (JAKEL et al., 2012).

4. Prävention

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, Katzen gegenüber einer Infektion mit FPV zu immunisieren: (1) die langanhaltende aktive Immunisierung und (2) die schnell aber nur kurzzeitig wirksame passive Immunisierung (TRUYEN et al., 2009).

4.1. Aktive Immunisierung

Die Impfung gegen FPV ist der wichtigste Faktor zur Reduktion der Prävalenz der feline Panleukopenie. Dabei können inaktivierte Impfstoffe und MLV gegen FPV effektiv zu einem langanhaltenden und sicheren Schutz vor einer feline Panleukopenie eingesetzt werden (SCOTT & GEISSINGER, 1999; GREENE & ADDIE, 2006). Neben dem aktiven Schutz der Katzen einer Population führt die Impfung auch dazu, dass die Virusausscheidung nach einer Infektion im

Vergleich zu ungeimpften Katzen signifikant niedriger ist (JAS et al., 2009), wodurch der Infektionsdruck innerhalb einer Population zusätzlich gesenkt wird. In der Studie von JAS und Mitarbeitern (2009), reduzierte eine Impfung sieben Tage vor einer experimentellen Infektion mit FPV die Ausscheidungs-Titer um mehrere \log_{10} -Stufen.

Für die Entwicklung einer belastbaren Immunität gegenüber FPV ist eine erfolgreiche Grundimmunisierung essentiell (BOEHM et al., 2004). Welpen, welche keine messbaren MDA haben, können bereits auf die erste Impfung mit einem Anstieg der Antikörper reagieren (DAWSON et al., 2001) und zeigen Antikörperanstiegsraten, welche mit denen ausgewachsener Tiere vergleichbar sind (PATTERSON et al., 2007; LAPPIN et al., 2009). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsmuster bezüglich des Zeitpunkts des Anstiegs und der Höhe der Antikörpertiter nach einer Impfung zwischen Wurfgeschwistern sehr ähnlich (Abweichungen um maximal eine Titerstufe) sind (JAKEL et al., 2012). Die empfohlene Frequenz der auf die Grundimmunisierung folgenden Wiederholungsimpfungen ist hauptsächlich von der nachgewiesenen Dauer der Immunität nach der Impfung abhängig. Entsprechende Impfeempfehlungen werden für die Katze regelmäßig von verschiedenen Expertengruppen aktualisiert und veröffentlicht (siehe II.4.1.2) (RICHARDS et al., 2006; 2009; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010).

In den USA und in Europa wurden früher über lange Zeit sowohl inaktivierte Impfstoffe (APPEL et al., 1979; CHAPEK et al., 1980; POLLOCK & CARMICHAEL, 1982) als auch MLV (CHAPPUIS & DURET, 1980) gegen FPV zur Impfung von Hunden eingesetzt und lizenziert. Der Schutz der FPV-Impfung vor einer Infektion mit CPV-Varianten bei Katzen wird jedoch kontrovers diskutiert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Impfungen gegen FPV Katzen auch sicher vor den klinischen Symptomen einer Infektion mit CPV-2b, und wegen bestehender Kreuzreaktivität, vermutlich auch gegen andere CPV-Varianten schützen (CHALMERS et al., 1999; GAMOH et al., 2005). Andere Autoren beurteilten den Schutz der FPV-Impfung vor einer Infektion mit CPV-Varianten jedoch kritisch (TRUYEN, 1997; NAKAMURA et al., 2001a), da in anderen Studien eine zum Teil verminderte Kreuzreaktivität beobachtet wurde (FLOWER et al., 1980; PARRISH et al., 1982; TRATSCHIN et al., 1982; TRUYEN, 1997; NAKAMURA et al., 2001a).

Grundsätzlich ist bei jeder aktiven Impfung mit dem Auftreten von leichten Nebenwirkungen wie z. B. einer lokalen Entzündungsreaktion (Schwellung, Schmerz) zu rechnen. Schwerwiegende Komplikationen, wie z. B. ein allergischer Schock oder das Auftreten von feline impfassozierten Sarkomen (FISS), sind selten (HORZINEK & THIRY, 2009; MODROW et al., 2010). Obwohl auch andere injizierbare Medikamente oder die Implantation eines Mikrochips als potentiell onkogen gelten, so stellen Impfungen derzeit doch die häufigste Ursache für die Bildung von FISS dar (KASS et al., 2003; SRIVASTAV et al., 2012).

In Deutschland geht man derzeit davon aus, dass nur etwa ein Drittel der Katzen über einen ausreichenden Impfschutz verfügt (BUNDESVERBAND PRAKTIZIERENDER TIERÄRZTE E. V., 2007). Ähnlich scheint es in angrenzenden europäischen Ländern zu sein. So wurden nach Schätzungen des Veterinary Products Committee (VPC) Berichtes der Working Group on Feline and Canine Vaccination (2002) im Vereinigten Königreich im Jahre 1999 nur 14 bis 36 % der Katzen regelmäßig geimpft (GASKELL et al., 2002).

4.1.1. Verfügbare Impfstoffe

Verschiedene Impfstofftypen gegen FPV sind seit den 1950er Jahren auf dem Markt. In Deutschland sind derzeit mehrere inaktivierte Impfstoffe und MLV erhältlich. Neben einer Monovakzine sind auch mehrere Kombinationsprodukte (meist mit Komponenten aus dem Katzenschnupfenkomplex) verfügbar (Tabelle 2) (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2013).

Tabelle 2: In Deutschland zugelassene Impfstoffe gegen feline Panleukopenie
(FCV: felines Calicivirus, FHV-1: felines Herpesvirus-1, *C. felis*: *Chlamydophila felis*, FeLV: felines Leukämievirus)

Einzelimpfstoffe			
Impfstoffname	Art des Impfstoffs		Hersteller
Eurifel P	lebend		Merial SAS, Frankreich
Kombinationsimpfstoffe			
Impfstoffname	Art des Impfstoffs	weitere Bestandteile	Hersteller
Eurifel RCPT	lebend	FCV, FHV-1, Tollwutvirus	Merial SAS, Frankreich
Felocell CVR	lebend	FCV, FHV-1	Zoetis Belgium SA, Belgien
Fevaxyn i-CHP	inaktiviert	FCV, FHV-1	Elanco Animal Health Ireland Limited, Irland
Fevaxyn i-CHP Chlam	inaktiviert	FCV, FHV-1, <i>C. felis</i>	Elanco Animal Health Ireland Limited, Irland
Fevaxyn Pentofel	inaktiviert	FCV, FHV-1, <i>C. felis</i> , FeLV	Elanco Animal Health Ireland Limited, Irland
Nobivac RCP	lebend	FCV, FHV-1	MSD Tiergesundheit, Deutschland
Nobivac RCP-Chlam	lebend	FCV, FHV-1, <i>C. felis</i>	MSD Tiergesundheit, Deutschland
Purevax RCP	lebend	FCV, FHV-1	Merial SAS, Frankreich
Purevax RCPCh	lebend	FCV, FHV-1, <i>C. felis</i>	Merial SAS, Frankreich
Purevax RCP FeLV	lebend	FCV, FHV-1, FeLV (Rekombinante)	Merial SAS, Frankreich
Versifel CVR	lebend	FCV, FHV-1	Zoetis Belgium SA, Belgien
Versifel CVR-T	lebend	FCV, FHV-1, Tollwutvirus	Zoetis Belgium SA, Belgien
Virbagen felis RCP	lebend	FCV, FHV-1	Virbac SAS, Frankreich
Virbagen felis RCP/T	lebend	FCV, FHV-1, Tollwutvirus	Virbac SAS, Frankreich

4.1.1.1. Modifizierte Lebendvakzinen

MLV werden über die kontinuierliche Vermehrung und Passagierung in Zellkulturen hergestellt. Die produzierten Virusvarianten verlieren ihre Virulenz, behalten jedoch die Fähigkeit zur Vermehrung bei. Sie verursachen eine abgeschwächte Infektion, die durch das gesunde Immunsystem leicht kontrolliert werden kann (MODROW et al., 2010). Das Impfvirus induziert die Bildung von überwiegend gegen virale Oberflächenmoleküle gerichteten, neutralisierenden Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen und damit einen langanhaltenden Schutz über die Stimulation von humoraler und zellulärer Immunität (MODROW et al., 2010; TIZARD, 2012d).

Im Vergleich zu inaktivierten Impfstoffen kommt es zu einer signifikant schnelleren und effektiveren Immunantwort (GREENE & ADDIE, 2006; LAPPIN, 2012). Bereits die einmalige Impfung mit MLV führt innerhalb weniger Tage zu einem schnellen Antikörperanstieg und vollständigen Schutz vor einer Infektion (BRUN et al., 1979; LAPPIN et al., 2002; PATTERSON et al., 2007; JAS et al., 2009). So waren in einer Studie Katzen, die am Tag der subkutanen Impfung in eine mit FPV kontaminierte Umgebung verbracht wurden, sofort geschützt (BRUN et al., 1979). In einer Studie bildeten Katzen nach einer einmaligen Injektion von MLV deutlich häufiger Antikörper als nach der einmaligen Verwendung von inaktivierten Impfstoffen (Antikörpertiter $\geq 1:40$; 85 % *versus* 31 %) (PATTERSON et al., 2007). Außerdem können im Rahmen der Grundimmunisierung MDA durch MLV signifikant schneller überwunden werden als durch inaktivierte Impfstoffe, so dass es innerhalb kürzerer Zeit zu einem Anstieg aktiv gebildeter Antikörper kommt (DIGANGI et al., 2012b). Der Einsatz von MLV wird demnach insbesondere dann empfohlen, wenn ein besonders schneller Schutz erwünscht wird. Dazu zählt der Einsatz in Tierheimen, infizierten Katzenzuchten und während Ausbrüchen (GREENE & ADDIE, 2006). MLV können mit dem Kot ausgeschieden werden, bleiben dabei infektiös und können, im Gegensatz zu inaktivierten Impfstoffen, somit auch andere Katzen einer Population immunisieren (GREENE & ADDIE, 2006).

MLV haben jedoch auch Nachteile. So kann ihr Einsatz bei trächtigen Katzen und Welpen, die jünger als vier Wochen sind, zu einer Störung der Entwicklung des Kleinhirns des Feten und Welpen führen (POLLOCK & POSTORINO, 1994; GREENE & ADDIE, 2006). Der Einsatz von MLV sollte ebenfalls nicht bei immunsupprimierten Katzen erfolgen, da bei diesen die Gefahr der Entstehung impfinduzierter Erkrankungen besteht (GREENE & ADDIE, 2006). Eine Wiedererlangung virulenter Eigenschaften wurde bislang jedoch nicht beobachtet (GREENE & SCHULTZ, 2006).

Wohingegen in Deutschland alle zugelassenen Impfstoffe gegen FPV parenteral appliziert werden, ist in den USA, neben ebenfalls parenteral zu applizierenden Impfstoffen, eine intranasal zu applizierende MLV, die Feline UltraNasal FVRCP (Heska Corporation, Loveland, Colorado, USA) zugelassen (LAPPIN et al., 2006). Die Bildung von Antikörpern nach der Verwendung einer intranasalen MLV ist mit der einer parenteralen MLV vergleichbar. Dies konnte sowohl an

ausgewachsene Katzen (LAPPIN et al., 2009), als auch an spezifisch-pathogen-freien (SPF) -Welpen gezeigt werden (PATTERSON et al., 2007; LAPPIN, 2012).

4.1.1.2. Inaktivierte Impfstoffe

Inaktivierte Impfstoffe können sich, anders als MLV, nicht im Tier vermehren und verhalten sich somit wie exogene Antigene. Sie führen über eine T-Helferzellen-Typ-2 dominierte Immunantwort vor allem zu der Bildung von neutralisierenden Antikörpern und aufgrund der fehlenden Proteinsynthese nur selten zu der Ausbildung einer Antwort der zytotoxischen T-Zellen (MODROW et al., 2010; TIZARD, 2012d). Die Inaktivierung sollte nach Möglichkeit die Antigenität, welche für die Stimulation einer aktiven Immunantwort notwendig ist, weitestgehend erhalten. Für die chemische Inaktivierung eignen sich z. B. Formaldehyde, Azetone, Alkohole und alkylierende Substanzen (TIZARD, 2012d).

Zu den Vorteilen eines inaktivierten Impfstoffs gehören die Stabilität bei der Lagerung, die Sicherheit, dass es nicht zu einer Wiedererlangung virulenter Eigenschaften kommen kann und der sichere Einsatz bei immunsupprimierten Tieren, tragenden Katzen und Welpen, die jünger als vier Wochen sind (GREENE & ADDIE, 2006; TIZARD, 2012d).

Inaktivierte Impfstoffe haben jedoch auch Nachteile. So sind mindestens zwei Impfungen notwendig, um einen Antikörperschutz zu erreichen, der mit dem einer einzigen Injektion einer MLV vergleichbar ist. Ein sicherer Schutz vor einer Infektion ist frühestens zwei bis drei Wochen nach der zweiten Impfung, die im Abstand von drei bis vier Wochen zur ersten Impfung erfolgt, zu erwarten (GREENE & ADDIE, 2006), da erst dann mit der Bildung von hohen Antikörpertitern und einer belastbaren und langanhaltenden Immunität zu rechnen ist (BITTLE et al., 1970; POVEY et al., 1980; SCOTT & GEISSINGER, 1999). Viele inaktivierte Impfstoffe enthalten zur Steigerung der Immunantwort Adjuvantien (wie z. B. Aluminiumsalze), welche im Verdacht stehen, mit der Bildung von FISS assoziiert zu sein (HENDRICK et al., 1992; SCHULTZE et al., 1997; MCENTEE & PAGE, 2001; MORRISON & STARR, 2001). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass FISS häufiger nach der Verwendung inaktivierter Impfstoffe auftraten (SRIVASTAV et al., 2012). Adjuvantien können zu

schwerwiegenden lokalen Entzündungen und, bei mehrfacher Wiederholung, zu Hypersensitivitätsreaktionen führen (DAY et al., 2007b; TIZARD, 2012d).

4.1.2. Leitlinien zur Impfung

Die Leitlinien zur Impfung von Katzen gegen FPV werden von verschiedenen nationalen und internationalen Expertengruppen regelmäßig auf der Grundlage aktueller Studienergebnisse überarbeitet und veröffentlicht. Bereits 1970 empfahl das „Panel of the American Veterinary Medical Association Colloquium on Selected Feline Infectious Diseases“ die Verwendung von tissue-culture-origin (TCO) -Impfstoffen, inaktivierten oder attenuierten Lebendimpfstoffen zum Schutz der Katzen vor einer Infektion mit FPV. Im Rahmen der Grundimmunisierung wurden mehrfache Impfungen bis zu einem Alter von 16 Wochen empfohlen, sowie im Folgenden jährliche Wiederholungsimpfungen. Die Verwendung von Antiseren wurde für exponierte, empfängliche Katzen und Welpen empfohlen, wenn sie ohne die Aufnahme von Kolostrum aufgezogen wurden (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 1970). Im Jahr 1978 postulierten Schultz und Scott „an ideal (but not proven) immunization schedule for dogs and cats“, in welchem sie bereits empfahlen, die Katzen zunächst ein Jahr nach den Welpenimpfungen und anschließend nur noch alle drei Jahre zu impfen (SCHULTZ & SCOTT, 1978).

Zur Zeit geben drei internationale Expertengruppen Leitlinien zur Impfung von Kleintieren heraus: (1) das American Association of Feline Practitioners (AAFP) Feline Vaccine Advisory Panel (ELSTON et al., 1998; RICHARDS & RODAN, 2001; RICHARDS et al., 2006), (2) die World Small Animal Veterinary Association Vaccine Guidelines Group (WSAVA VGG) (DAY et al., 2007a, 2010) und (3) das European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD) (TRUYEN et al., 2009; EUROPEAN ADVISORY BOARD ON CAT DISEASES, 2012). In Deutschland gibt zudem die Ständige Impfkommision Veterinär (StIKo Vet.) im Bundesverband Praktizierender Tierärzte e. V. (BPT) regelmäßig eine Leitlinie zur Impfung von Kleintieren heraus (STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Internationale und nationale Leitlinien zur Impfung von Kleintieren gegen feline Panleukopenie (AAFP: American Association of Feline Practitioners, ABCD: Advisory Board on Cat Diseases, WSAVA: World Small Animal Veterinary Association, StIKo Vet.: Ständige Impfkommision Veterinär, MDA: maternale Antikörper, MLV: modifizierte Lebendvakzine, k. A.: keine Angabe)

	AAFP	ABCD	WSAVA	StIKo Vet.
Publikation/ Autoren	(RICHARDS et al., 2006)	(TRUYEN et al., 2009; EUROPEAN ADVISORY BOARD ON CAT DISEASES, 2012)	(DAY et al., 2010)	(STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013)
Region	USA	Europa	International	Deutschland
Einstufung der Impfung	Core	Core	Core	Core
Erstimpfung von Welpen	Beginn im Alter von sechs Wochen; Wiederholungsimpfungen alle drei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen; bei Gefahr eines Ausbruchs Beginn im Alter von vier Wochen mit MLV	Beginn im Alter von acht bis neun Wochen; Wiederholungsimpfungen alle drei bis vier Wochen bis zu einem Alter von zwölf Wochen, bei hohen MDA und/oder erhöhtem Infektionsrisiko bis zu einem Alter von 16 Wochen; bei Gefahr eines Ausbruchs Beginn im Alter von vier Wochen mit MLV	Beginn im Alter von acht bis neun Wochen; Wiederholungsimpfungen alle drei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen	im Alter von acht, zwölf und 16 Wochen
Erstimpfung von Katzen älter als 16 Wochen	ab einem Alter von 16 Wochen zweimalige Impfung im Abstand von drei bis vier Wochen	k. A.	ab einem Alter von 16 Wochen zweimalige Impfung im Abstand von drei bis vier Wochen	ab einem Alter von 16 Wochen einmalige Impfung mit MLV oder zweimalige Impfung mit inaktivierten Impfstoffen im Abstand von drei bis vier Wochen
Impfung von ausgewachsenen Katzen mit unbe- kanntem Impfstatus	k. A.	einmalige Impfung mit MLV	einmalige Impfung mit MLV	einmalige Impfung mit MLV oder zweimalige Impfung mit inaktivierten Impfstoffen im Abstand von drei bis vier Wochen

Fortsetzung Tabelle 3: Internationale und nationale Leitlinien zur Impfung von Kleintieren gegen feline Panleukopenie (AAFP: American Association of Feline Practitioners, ABCD: Advisory Board on Cat Diseases, WSAVA: World Small Animal Veterinary Association, StIKo Vet.: Ständige Impfkommision Veterinär, FIV: feline Immunschwächevirus, FeLV: feline Leukämievirus, MLV: modifizierte Lebendvakzine, k. A.: keine Angabe)

	AAFP	ABCD	WSAVA	StIKo Vet.
Welpen in Tierheimen	Welpen in Tierheimen ab einem Alter von sechs Wochen mit MLV; im Falle eines Ausbruchs ab einem Alter von vier Wochen; bei erhöhtem Risiko alle zwei Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen	Welpen in Tierheimen ab einem Alter von sechs Wochen mit MLV; im Falle eines Ausbruchs ab einem Alter von vier Wochen	Welpen in Tierheimen vor oder zum Zeitpunkt der Aufnahme im Alter von vier bis sechs Wochen mit MLV; Wiederholungsimpfungen alle zwei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen	Welpen in Tierheimen zum Zeitpunkt der Aufnahme; Wiederholungsimpfungen nach Infektionslage alle zwei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen
Auffrischungsimpfungen (alle Katzen)	zwölf Monate nach den ersten Impfungen; anschließend nicht häufiger als alle drei Jahre	zwölf Monate nach den ersten Impfungen; anschließend nicht häufiger als alle drei Jahre	zwölf Monate nach den ersten Impfungen; anschließend nicht häufiger als alle drei Jahre	im Alter von 15 Monaten; anschließend im Abstand von drei Jahren
Tragende Tiere und Welpen	MLV nicht bei tragenden Tieren oder Welpen unter vier Wochen; tragende Kätzinnen können im Ausnahmefall mit inaktivierten Impfstoffen geimpft werden	MLV nicht bei tragenden Tieren oder Welpen unter vier Wochen; tragende Kätzinnen können im Ausnahmefall mit inaktivierten Impfstoffen geimpft werden	MLV nicht bei tragenden Tieren oder Welpen unter vier Wochen; tragende Kätzinnen können im Ausnahmefall mit inaktivierten Impfstoffen geimpft werden	k. A.
Laktierende Kätzinnen	laktierende Kätzinnen nicht impfen	k. A.	k. A.	k. A.
FIV-/FeLV-infizierte Katzen	FIV-/FeLV-infizierte Katzen nur mit inaktivierten Impfstoffen impfen	FIV-/FeLV-infizierte Katzen nur mit inaktivierten Impfstoffen impfen; FeLV-infizierte Katzen eventuell häufiger impfen	FIV-/FeLV-infizierte Katzen nur mit inaktivierten Impfstoffen impfen	k. A.
Glukokortikoidtherapie	zum Zeitpunkt der Impfung keine Glukokortikoide verabreichen	zum Zeitpunkt der Impfung keine Glukokortikoide verabreichen	zum Zeitpunkt der Impfung keine Glukokortikoide verabreichen	k. A.

Alle Gruppen empfehlen, dass nach Möglichkeit jede Katze geimpft werden sollte, dies aber nur so selten wie nötig. Für jede Katze sollte vor einer Impfung eine Nutzen-Risiko-Analyse durchgeführt werden. Impfungen sollten nach „Core“, „Non-Core“ und „Not recommended“ klassifiziert werden. Dabei gehören zu den „Core-Impfungen“ Impfungen gegen Erkrankungen mit besonders schweren Konsequenzen, zoonotischem Risiko sowie hoher Prävalenz, leichter Übertragbarkeit und damit erheblichem Risiko für die Population. Zu den „Non-Core-Impfungen“ gehören Impfungen gegen Erkrankungen, deren Risiko vom Ort und von den Lebensumständen abhängt. Aufgrund der Ubiquität und der schweren Folgen einer Infektion wird die Impfung gegen FPV von allen Gruppen für jede Katze empfohlen und somit als „Core-Impfung“ klassifiziert (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013).

WSAVA, ABCD und StIKo Vet. empfehlen mit der Impfung in einem Alter von acht bis neun Wochen zu beginnen, die AAFP empfiehlt dies grundsätzlich bereits in einem Alter von sechs Wochen. Im Rahmen der Grundimmunisierung sollten nach allen Leitlinien die Wiederholungsimpfungen in einem zeitlichen Abstand von drei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen wiederholt werden (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013). ABCD rät dabei zunächst mindestens bis zu einem Alter von zwölf Wochen, bei hohen MDA-Titern und/oder erhöhtem Infektionsrisiko bis zu einem Alter von 16 Wochen zu impfen (TRUYEN et al., 2009). Darüber hinaus empfehlen AAFP und ABCD, bei der Gefahr eines Ausbruchs, Welpen bereits ab einem Alter von vier Wochen mit einer MLV in einem drei- bis vier-wöchigen Abstand bis zu einem Alter von 16 Wochen zu impfen. Des Weiteren empfehlen sie, Katzen in Tierheimen ab der sechsten Lebenswoche mit MLV zu impfen und im Falle eines Ausbruchs diese ebenfalls schon ab der vierten Lebenswoche zu impfen (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009). AAFP, WSVA und StIKo Vet. empfehlen, Welpen in Tierheimen bei erhöhtem Risiko sogar alle zwei Wochen zu impfen (RICHARDS et al., 2006; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013).

Alle Expertengruppen empfehlen zwölf Monate nach den Welpenimpfungen (Grundimmunisierung) eine Auffrischungsimpfung. Anschließend Auffrischungsimpfungen sollten nicht häufiger als alle drei Jahre durchgeführt

werden (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013).

AAFP und die WSAVA empfehlen für Katzen, die bei der Vorstellung zur Grundimmunisierung 16 Wochen oder älter sind, zweimal im Abstand von drei bis vier Wochen und einmal nach zwölf Monaten zu impfen (RICHARDS et al., 2006; DAY et al., 2010). Für ausgewachsene Katzen mit unbekannten Impfstatus raten WSAVA, ABCD nur noch zu einer Dosis mit einer MLV, gefolgt von einer Wiederholungsimpfung nach zwölf Monaten (TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010). Die StIKo Vet. empfiehlt grundsätzlich alle Tiere, die ab einem Alter von 16 Wochen vorgestellt werden, einmal mit einer MLV oder zweimal in einem Abstand von drei bis vier Wochen mit einem inaktivierten Impfstoff und anschließend nach zwölf Monaten erneut zu impfen (STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013).

Außerdem empfehlen AAFP, ABCD und WSAVA, MLV nicht bei tragenden Tieren und Welpen unter vier Wochen einzusetzen, da dies zu Missbildungen des Kleinhirns während der Entwicklung führen kann. Im Ausnahmefall könnten bei tragenden Tieren inaktivierte Impfstoffe eingesetzt werden. Katzen, welche mit felinem Immunschwächevirus (FIV) oder felinem Leukämievirus (FeLV) infiziert sind, sollten nur mit inaktivierten Impfstoffen geimpft werden. Außerdem empfehlen sie, zum Zeitpunkt der Impfung auf den Einsatz von Glukokortikoiden zu verzichten (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010). ABCD empfiehlt zudem, FeLV-infizierte Katzen gegebenenfalls häufiger zu impfen, da die Immunantwort auf die Impfung möglicherweise nur eingeschränkt sei (TRUYEN et al., 2009). AAFP empfiehlt, laktierende Tiere aufgrund der zu erwartenden Beeinträchtigung des Immunsystems (Stress durch Impfung) und einer möglichen Beeinträchtigung der Milchbildung nicht zu impfen (RICHARDS et al., 2006).

4.1.3. Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes

Der optimale Impfzeitpunkt für die erste Impfung gegen FPV ist der frühestmögliche Zeitpunkt, an dem die MDA soweit abgesunken sind, dass es nicht mehr zur Interferenz mit einer Impfung kommt. Für eine Berechnung dieses Zeitpunktes wurden bislang verschiedene Empfehlungen ausgesprochen. Eine aktuelle Studie empfiehlt den individuellen Antikörpertiter des Welpen zu Grunde

zu legen (JAKEL et al., 2012) und gibt dazu eine Formel an, um den optimalen Impfzeitpunkt zu berechnen (Abbildung 1).

$$a = age + 8,8 \frac{\ln(titer) - \ln(b)}{\ln(2)}$$

Abbildung 1: Berechnung des optimalen Impfzeitpunkts nach JAKEL und Mitarbeitern (2012) (a = Alter bei Erreichen des Zielantikörpertiters in Tagen; age = Alter des Welpen in Tagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme; $titer$ = Antikörpertiter am Tag der Blutentnahme; b = Zielantikörpertiter)

Nach JAKEL und Mitarbeitern (2012) können die bei einem Einzeltier ermittelten Ergebnisse aufgrund ähnlicher Reaktionsmuster zwischen den Wurfgeschwistern innerhalb eines Wurfes generalisiert werden.

SCOTT und Mitarbeiter (1970c) erstellten eine Gleichung zur Berechnung des Abfalls der MDA basierend auf dem Antikörpertiter der Mutter (Abbildung 2).

$$a = 4,5 \cdot (b - c)$$

Abbildung 2: Gleichung zur Berechnung des Abfalls der maternalen Antikörper bei Katzenwelpen nach SCOTT und Mitarbeitern (1970c) (a = Alter des Welpen in Wochen bei Erreichen des Zielantikörpertiters; b = -log-Wert des Zielantikörpertiters; c = -log-Wert des Antikörpertiters der Mutter)

FRIEDRICH und TRUYEN (2000) empfahlen in einer Studie im Jahr 2000, die Welpen vor der Impfung zu testen. Dabei sei aufgrund der Gleichmäßigkeit der Antikörpertiter zwischen Wurfgeschwistern die Bestimmung eines beliebigen Welpen (bezeichnet auch als „fraternaler Antikörpertiter“) vorteilhafter als der Antikörpertiter des Muttertieres (FRIEDRICH & TRUYEN, 2000).

4.1.4. Impfversager und Impfdurchbrüche

Trotz der Impfung gegen FPV gemäß den aktuellen nationalen und internationalen Leitlinien bildet ein Teil der Welpen nach der Grundimmunisierung nachweislich keine Antikörper (JAKEL et al., 2012). Auch werden regelmäßig schwere Fälle von feline Panleukopenie bei vorberichtlich geimpften Katzen beobachtet (ADDIE et al., 1998; HORLACHER et al., 2002; KRUSE et al., 2010).

In der Zeit zwischen 2008 und 2011 gingen beim PEI insgesamt 250 Meldungen über unerwünschte Reaktionen nach Impfungen ein (HOFFMANN et al., 2010; HOFFMANN et al., 2011; HOFFMANN et al., 2012). Davon wurde in insgesamt 26 Fällen der Verdacht auf eine mangelhafte Wirksamkeit der Impfung gegen feline Panleukopenie geäußert. Im Jahr 2008 fiel insbesondere eine Häufung der Fälle bei Norwegischen Waldkatzen auf (HOFFMANN et al., 2010). Der anfängliche Verdacht einer Rasseprädisposition für das Versagen der Impfung konnte in einer groß angelegten Studie jedoch nicht bestätigt werden (JAKEL et al., 2012).

Die wichtigsten und häufigsten Gründe für eine ungenügende Immunität sind ein sehr niedriges Alter und, aufgrund der Interferenz mit MDA während der ersten Welpenimpfungen, eine fehlende oder nur unzureichende aktive Bildung von Antikörpern (GREENE & ADDIE, 2006; JAKEL et al., 2012). Mit dem Abfall der MDA kommt es insbesondere in der Zeit nach dem Absetzen zu einer Häufung der Fälle von feline Panleukopenie (GILLESPIE & SCOTT, 1973; HORLACHER et al., 2002).

Für das Versagen einer Impfung kann es jedoch auch verschiedene andere Gründe geben. Neben der falschen Lagerung kann auch die Wahl der falschen Applikationsroute zu einer mangelhaften Immunantwort führen. Außerdem kommen genetische Faktoren, Umweltfaktoren, Immunsuppression aufgrund von schwerer Infestation durch Endo- oder Ektoparasiten, Mangelernährung, Virusinfektionen (FeLV/FIV), die Verabreichung immunsupprimierender Medikamente sowie eine gleichzeitige schwere Erkrankungen oder Stress (Trächtigkeit, Laktation, Erschöpfung, extreme Hitze/Kälte) als Ursachen in Betracht (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; TIZARD, 2012e). Glukokortikoide können über die Hemmung des Transkriptionsfaktors nuclear factor-kappa B (NF- κ B) eine Vielzahl an zellulären Signalwegen der zellulären und humoralen Immunantwort beeinflussen (TIZARD, 2012g). Entsprechende

Studien fehlen jedoch bei der Katze. Beim Hund führte eine kurzzeitige Gabe von verschiedenen Dosierungen von Prednisolon (1 Milligramm (mg)/Kilogramm (kg) und 10 mg/kg) zu keiner Beeinträchtigung der Impfung mit einer MLV gegen das canine Staupevirus (CDV). Die Hunde bildeten innerhalb von 21 Tagen (genauso wie die Kontrollgruppe) Antikörper nach der Impfung und zeigten nach einer experimentellen Infektion keine klinischen Symptome einer CDV-Infektion (NARA et al., 1979). Bei Katzen mit bestehender FeLV-Infektion konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Tiere nach einer Impfung gegen Tollwut keinen ausreichenden Schutz aufbauen konnte (FRANCHINI, 1990). Bei den T-Helferzellen dieser Katzen ist bereits in einem frühen Stadium einer FeLV-induzierten Immunschwäche die Produktion von Faktoren zur Stimulation von B-Zellen deutlich eingeschränkt (DIEHL & HOOVER, 1992). Bei FIV-infizierten Katzen kann die Impfung eventuell sogar zu einer gesteigerten Virusproduktion führen. *In vitro* konnte nach einer Immunstimulation FIV-infizierter Lymphozyten eine vermehrte Virusproduktion beobachtet werden, *in vivo* kam es in einer Studie nach einer Impfung zu einer Verringerung des $CD4^+/CD8^+$ T-Zell-Verhältnisses (LEHMANN et al., 1992; REUBEL et al., 1994). Eine experimentell FIV-infizierte Katze entwickelte nach der Impfung mit einer MLV gegen FPV Symptome einer feline Panleukopenie (BUONAVOGLIA et al., 1993). Katzen haben eventuell auch mit zunehmendem Alter ein erhöhtes Risiko, nicht adäquat auf eine Impfung zu reagieren. Dies wurde jedoch nur in einer einzigen Studie mit einer Impfung gegen Tollwut gezeigt (MANSFIELD et al., 2004). Eine zum Zeitpunkt der Impfung gegen FPV durchgeführte Kastration oder Narkose hatte dagegen in verschiedenen Studien weder bei Katzenwelpen noch bei ausgewachsenen Katzen einen negativen Einfluss auf den Anstieg der Antikörper (FISCHER et al., 2007; REESE et al., 2008).

4.2. Passive Immunisierung

Die passive Immunisierung ist die Verabreichung von spezifischen Antikörpern. Sie dient der Prävention einer feline Panleukopenie bei empfänglichen Katzen (insbesondere bei unvollständiger oder fehlender Impfung und bei Welpen bei mutterloser Aufzucht) nach einer Exposition oder im Falle eines Ausbruches. Eine passive Immunisierung kann auch bei der Aufnahme in Tierheime bei besonders hohem Infektionsdruck empfohlen werden (TRUYEN et al., 2009).

Die Effizienz einer passiven Impfung, eine Infektion mit FPV zu verhindern, ist abhängig von der Antikörperkonzentration, vom verabreichten Volumen und vom Zeitpunkt der Applikation relativ zur Exposition (TRUYEN et al., 2009). Wie bei MDA ist mit einem graduellen Abfall des Antikörpertiters nach der Verabreichung und einer Halbwertszeit von etwa neun Tagen zu rechnen (SCOTT et al., 1970c; JAKEL et al., 2012). Ebenfalls ähnlich wie bei MDA führt auch hier eine Infektion zu einem beschleunigten Abfall des Antikörpertiters. Im Falle einer Infektion ist außerdem mit einer verzögerten Inkubationszeit, einer verzögerten Ausscheidung des Virus und mit einem verzögerten Anstieg der Antikörper im Vergleich zu Katzen ohne passiven Schutz zu rechnen (MACARTNEY et al., 1988). Da die enthaltenden Antikörper auch an entsprechende Epitope des Impfvirus binden und Immunkomplexe bilden, sollten die Tiere nach der Verabreichung passiver Antikörper nicht innerhalb der darauf folgenden drei Wochen geimpft werden (TRUYEN et al., 2009).

Homologe anti-FPV-Seren wurden bereits früh in der Prophylaxe und zur Therapie in der frühen Erkrankungsphase einer feline Panleukopenie eingesetzt (HOLZWORTH, 1966; JOHNSON, 1969). Diese Seren (Immunseren und Hyperimmunseren) können selbst hergestellt und verabreicht werden. Immunseren werden von gesunden Tieren gewonnen, die die entsprechende Krankheit in der Vergangenheit überwunden haben; Hyperimmunseren werden von Tieren gewonnen, die zuvor mehrfach gegen die entsprechende Krankheit geimpft wurden (TRUYEN et al., 2009). Der Antikörpertiter und damit auch die Dauer des zu erwartenden Schutzes sind bei diesen selbst hergestellten Produkten nicht bekannt. Im Allgemeinen ist jedoch von einem Schutz von etwa zwei bis vier Wochen auszugehen (GREENE & ADDIE, 2006; TRUYEN et al., 2009). Idealerweise sollten die Blutgruppen von Spender und Empfänger übereinstimmen. Die empfohlene Dosis beträgt 2 bis 4 Milliliter (ml) Serum/kg Körpergewicht und kann subkutan (s. c.) oder intraperitoneal (i. p.) verabreicht werden (GREENE & ADDIE, 2006; TRUYEN et al., 2009).

In einigen europäischen Ländern sind kommerzielle, heterolog im Pferd hergestellte Hyperimmunglobulin-Produkte für Katzen auf dem Markt. Sie enthalten Antikörper gegen FPV, felines Herpesvirus-1 (FHV-1) und felines Calicivirus (FCV) und sind für die Prophylaxe (Dosierung meist eine Ampulle/Tier s. c., einmalig) und die Therapie (Dosierung eine Ampulle/Tier

s. c., drei Injektionen im Abstand von 24 Stunden) zugelassen. In klinischen Studien an 685 Katzen konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Injektion mit Feliserin[®] (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, Deutschland) am Tag der Einstellung in eine FPV-kontaminierte Umgebung etwa zehn Tage vor der Entwicklung einer feline Panleukopenie schützt (ERHARDT, 1977). Bei der Verwendung dieser equinen Produkte kann der wiederholte Einsatz jedoch zu anaphylaktischen Reaktionen auf heterologe Proteine führen, sobald die Abstände zwischen den Applikationen mehr als eine Woche betragen (HARTMANN & HEIN, 2002). Für das derzeit in Deutschland zugelassene Produkt Feliserin PRC[®] (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, Deutschland) wird daher zur Prophylaxe nur eine einmalig Applikation empfohlen (HARTMANN & HEIN, 2002).

III. STUDIE 1

Prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in client-owned cats in Southern Germany

Katherina Mende¹

Bianca Stuetzer¹, Dr. med. vet.

Carola Sauter-Louis², Dr. med. vet.

Timo Homeier³, Dr. med. vet.

Uwe Truyen³, Prof. Dr. med. vet. habil.

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. , Dipl. ECVIM-CA

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet of Munich, Germany

² Clinic of Ruminants and Herd Management, Ludwig-Maximilians-Universitaet of Munich, Germany

³ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany

The Veterinary Journal, veröffentlicht

The Veterinary Journal Mar, 199(3):419-23; doi: 10.1016/j.tvjl.2013.12.023

ARTICLE IN PRESS

The Veterinary Journal xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in client-owned cats in Southern Germany

Katherina Mende^{a,*}, Bianca Stuetzer^a, Carola Sauter-Louis^b, Timo Homeier^c, Uwe Truyen^c, Katrin Hartmann^a

^a Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

^b Clinic of Ruminants and Herd Management, Ludwig-Maximilians-Universität of Munich, Sonnenstrasse 16, 85764 Oberschleißheim, Germany

^c Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 31 December 2013
Available online xxxx

Keywords:
Feline panleukopenia virus
Haemagglutination inhibition
Titre
Parvovirus
Vaccination

ABSTRACT

Feline panleukopenia is a frequent and commonly fatal disease of cats. Recent published studies have raised suspicions that some cats fail to develop antibodies after vaccination. The purpose of this study was to assess the prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus (FPV) in cats in Southern Germany, and to identify factors that are associated with a lack of antibodies. In total, 350 cats presented to the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität were randomly included in the study. Information regarding signalment, origin, environment, lifestyle, housing conditions, health status, chronic diseases, glucocorticoid therapy, and vaccination status were collected. Antibodies were detected by haemagglutination inhibition test. Asymptomatic chi-squared tests and univariable logistic regression were used to investigate associations between a lack of antibodies and the different variables. Associations determined to be statistically significant at $P < 0.1$ were verified by a multivariable logistic regression analysis.

Of the 350 cats, 103 (29.4%) had no antibodies against FPV. Chronic kidney disease, neoplasia, glucocorticoid therapy, and vaccination status were significantly associated with a lack of antibodies. The cats with no antibodies were likely to have inadequate immunity against panleukopenia and those with chronic diseases or receiving glucocorticoids were less likely to be protected.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Feline panleukopenia is a disease of high morbidity and high mortality for all members of the Felidae family (Barker et al., 1983; Scott, 1987; Kruse et al., 2010). Consequently, vaccination is strongly recommended for all cats and belongs to the core category according to the American Association of Feline Practitioners (AAFP) and other expert groups (Richards et al., 2006; Truyen et al., 2009; Day et al., 2010; Ständige Impfkommission Veterinär, 2013).

Vaccine-induced antibodies correlate with protection against infection with feline panleukopenia virus (FPV) and measurement of antibodies can be used to evaluate the specific immune status of individual cats (Scott and Geissinger, 1999; Lappin et al., 2002). The presence of antibodies indicates previous vaccination or exposure to the virus. One study in the USA showed that 67% of 267 client-owned cats had antibodies against FPV (Lappin et al., 2002). However, the current protection of the population in Germany is unknown and feline panleukopenia is still commonly diagnosed despite widespread vaccination (Kruse et al., 2010).

Vaccination against FPV does not always seem to be effective. In 2008/2009, several outbreaks of feline panleukopenia in Norwegian Forest cats (NFC) were reported in Germany (Hoffmann et al., 2010) and a subsequent field study revealed that 36.7% of kittens did not develop antibodies despite three basic vaccinations at the age of 8, 12, and 16 weeks. Maternally derived antibodies (MDA) that interfered with primary vaccination and prevented antibody development were detected until 20 weeks of age (Jakel et al., 2012). Recently, it was shown that cats entering an animal shelter in Florida were more likely to have antibodies when they were neutered or older than 6 months (DiGangi et al., 2012). However, studies of associated factors in client-owned cats with a known history (including vaccination status) are missing.

It is also currently unknown whether vaccination is effective and safe in immunocompromised cats that receive immunosuppressive drugs or suffer from chronic diseases (Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009; Truyen et al., 2009). In a study with dogs, different doses of glucocorticoids over a short period of time did not affect responses to immunization (Nara et al., 1979). However, cats that are infected with feline leukemia virus (FeLV) do not respond adequately to vaccination (Franchini, 1990) and a similar situation might occur in cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV).

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 2651.

E-mail address: katherina.mende@googlemail.com (K. Mende).

The objectives of this study were (1) to provide information about the prevalence of antibodies against FPV in the field to estimate the protection rate in cats and (2) to identify factors associated with a lack of antibodies to determine groups that are particularly at risk.

Materials and methods

Cats

The protocol of this prospective cross-sectional study was approved by the ethical committee of the Ludwig-Maximilians-Universität (approval number 3-5-10-2012).

In total, 350 cats that were presented from December 2011 to June 2012 to the Clinic of Small Animal Medicine and to the Clinic of Small Animal Surgery and Gynaecology of the Ludwig-Maximilians-Universität were randomly included into the study. In each of these cats blood had been taken for various unrelated reasons. Cats were excluded if (1) serum preparations containing antibodies against FPV had been administered within 6 months of presentation, or (2) if no historical data were available (i.e., in stray cats). Information about signalment (breed, age, sex, neutering status), origin (breeder, animal shelter, foreign country, adopted stray cats, or private household), environment (urban or rural), lifestyle (currently indoors or outdoors), housing conditions (single- or multi-cat household), health status (healthy, acute or chronic diseases), and vaccination status were recorded.

A complete vaccination against FPV according to current guidelines (Richards et al., 2006; Truyen et al., 2009; Day et al., 2010; Ständige Impfkommission Veterinär, 2013) was defined as a completed primary vaccination including a booster at 16 weeks of age and a further booster after 1 year, followed by regular vaccinations on a triennial basis. The health status was judged by history and physical examination on the day of presentation. Any disease that had been present for at least 4 weeks (according to the owner or known time point of diagnosis) was classified as chronic, others were defined as acute. In addition, FIV and FeLV status and current therapy with glucocorticoids were recorded.

Detection of antibodies by haemagglutination inhibition test

Serum samples as well as positive and negative serum controls for test validation were heat inactivated (56 °C, 30 min), diluted with borate buffered saline (BBS) 1:5, and pre-adsorbed to 15 µl of a 50% suspension of swine erythrocytes in phosphate buffered saline (PBS) for 1 h at 4 °C. After centrifugation at 12,000 g for 5 min, the supernatant was serially diluted twofold over 12 steps beginning at 1:10 in 96-well V-bottom plates (Greiner Bio-One). Eight haemagglutinating units of FPV-b (strain 292), as described previously (Scott et al., 1970a; Parrish and Carmichael, 1983) in BBS were added to each well and incubated for 1 h at room temperature. A 0.5% suspension of swine erythrocytes in phosphate buffered saline (PBS) was then added and incubated at 4 °C overnight. The following day, plates were read by two independent evaluators (KM and an experienced laboratory technician). Divergent results were re-checked by a further laboratory technician who was blinded to the results of the other two individuals. All three were blinded to the history of the cats.

The antibody titre was expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum displaying haemagglutination inhibition (HI). As antibody titres $\geq 1:40$ are suggestive of resistance to infection with FPV, results $\geq 1:40$ were defined as positive (Scott et al., 1970b; Scott and Geissinger, 1999; Lappin et al., 2002; Mouzin et al., 2004).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in PASW version 18.0. A power analysis was conducted before beginning of the study to estimate the required sample size, assuming a prevalence of 70% and a desired precision of 5%. In order to achieve a power of $\geq 80\%$, a sample size of at least 323 animals was required.

Prevalence of antibodies was calculated as the proportion of positive results in HI of the total number of tested sera. To quantify uncertainty, 95% confidence intervals (CI) were calculated. Analysis of association of antibodies with breed was restricted to the two most common breeds, namely, European short hair and Maine Coon. A factor 'exposure risk' was introduced. Cats with current access to outdoors or a history of cattery or cat show were categorized as 'high exposure risk' in contrast to 'low exposure risk'. Diseases with frequencies of $>5\%$ in the study population were analysed and included chronic kidney disease (CKD), diabetes mellitus (DM), neoplasia, and FIV infection. A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to determine the best cut-off for the duration of glucocorticoid therapy (Fawcett, 2006).

An univariable analysis was performed to investigate associations between the antibody status of the animals and the different variables. All categorical variables with two categories were analysed using asymptotic chi-squared tests, unless an expected number in one of the cells in the contingency table was <5 , in which case Fisher's exact test was used to assess statistical significance ($P < 0.05$). All categorical variables with more than two categories were analysed using univariable

logistic regression. Odds ratios (OR) and 95% CI were calculated to examine the strength of the associations between the categorical variables and the status of the animal. All variables with $P < 0.1$ in the univariable analysis were offered to a multivariable logistic regression analysis with backwards stepwise selection using a Wald $P < 0.05$ as a selection criterion. The variable breed was forced into the model, despite not fulfilling the selection criterion, as it was supposed to be a risk factor in earlier reports (Hoffmann et al., 2010). Variables that were dependent on other variables (duration of glucocorticoid therapy and time after vaccination) were excluded from the multivariable analysis, as they would have substantially reduced the dataset. Due to missing data in the variables, the final dataset for the multivariable analysis contained complete data for 212 cats. The significance level was set at $\alpha = 0.05$.

Results

Antibody prevalence

Antibodies against FPV were not detectable in 29.4% (103/350; 95% CI, 24.6–34.2%) and were detectable in 70.6% (247/350; 95% CI, 65.8–75.4%) of cats. Of all 350 cats, 47 (13.4%) had been vaccinated adequately and 238 inadequately according to the current guidelines. Thus, only 47/285 (16.5%) vaccinated cats had been vaccinated following the new guidelines (Richards et al., 2006; Truyen et al., 2009; Day et al., 2010; Ständige Impfkommission Veterinär, 2013). Of those, 11/47 (23.4%) had no antibodies. However, antibodies were found in 8/28 cats (28.6%) that had never been vaccinated.

Associated factors

In the univariable analysis, the factors origin, exposure risk, neoplasia, glucocorticoid therapy, and vaccination status were all significantly associated with a lack of antibodies against feline panleukopenia (Table 1). The duration of glucocorticoid therapy was categorized as short (<11 weeks) and long (≥ 11 weeks) by ROC analysis. A duration of glucocorticoid therapy ≥ 11 weeks was significantly associated with a lack of antibodies ($P = 0.024$).

The multivariable logistic regression analysis confirmed presence of neoplasia ($P = 0.010$), glucocorticoid therapy ($P = 0.016$), and vaccination status ($P < 0.001$) as associated factors. In addition, CKD was significantly associated with a lack of antibodies ($P = 0.037$). The factors origin and exposure risk were not retained in the multivariable logistic regression analysis (Table 1).

Discussion

In this study, 29.4% of the cats in this study had no antibodies detectable, indicating that they were not protected against infection with FPV at the time of presentation and at risk of acquiring a disease that is potentially life-threatening.

Former comparable studies have shown conflicting results. A comparatively high prevalence of antibodies was found in domestic cats in a metropolitan area of Costa Rica (92.8%) (Blanco et al., 2009), although only 17.8% of the cats were reported to have been previously vaccinated. Remarkably lower antibody prevalence rates (39.8%) were observed in cats entering a Florida animal shelter (DiGangi et al., 2012) but these were mainly young, sexually intact, healthy animals, and most (67%) were strays of unknown vaccination status. A low antibody prevalence was also found in a study of 15 separated rural populations of non-vaccinated cats in France with an average antibody prevalence of 25.0% (private cats 36.6% vs. stray cats 15.9%) (Hellard et al., 2011).

A study including 267 client-owned cats in the USA (Lappin et al., 2002), however, found an antibody prevalence of 67%, which is similar to the present study. Different vaccination rates between countries and study populations might in part explain these divergent results. In addition, differences in the frequency of natural

ARTICLE IN PRESS

K. Mende et al./The Veterinary Journal xxx (2014) xxx–xxx

3

Table 1

Factors associated with lack of antibodies against FPV in univariable and multivariable analysis (bold = statistically significant).

Variable	Total number	Category	Number tested	Number antibody-negative (%)	Univariable analysis			Multivariable analysis		
					Odds ratio (antibody-negative)	95% Confidence interval (antibody-negative)	P (univariable analysis)	Odds ratio (antibody-negative)	95% CI (antibody-negative)	P (multivariable analysis)
Breed	289	Maine Coon	13	6 (46.2)	2.10	0.69–6.44	0.217			
		European short hair	276	80 (29.0)	Ref. value	NA	NA			
Age	350	0–2 years	53	17 (32.1)	0.94	0.47–1.91	0.874			
		2–7 years	93	27 (29.0)	0.81	0.45–1.50	0.515			
		7–12 years	99	24 (24.2)	0.64	0.35–1.18	0.154			
		≥ 12 years	105	35 (33.3)	Ref. value	NA	NA			
Sex	350	Male	200	59 (29.5)	1.01	0.63–1.60	0.973			
		Female	150	44 (29.3)	Ref. value	NA	NA			
Neutering status	350	Intact	42	13 (31.0)	1.09	0.54–2.18	0.817			
		Neutered	308	90 (29.2)	Ref. value	NA	NA			
Origin	303	Breeder	30	13 (43.3)	1.58	0.71–3.53	0.265			
		Shelter	42	11 (26.2)	0.73	0.39–1.59	0.430			
		Foreign	59	9 (15.3)	0.37	0.17–0.82	0.014			
		Country								
		Adopted	31	10 (32.3)	0.98	0.43–2.26	0.969			
		stray cat								
		Private household	141	46 (32.6)	Ref. value	NA	NA			
Environment	350	Urban	299	93 (31.1)	1.85	0.89–3.85	0.096			
		Rural	51	10 (19.6)	Ref. value	NA	NA			
Lifestyle	330	Indoors	194	65 (33.5)	1.64	1.00–2.69	0.050			
		Outdoors	136	32 (23.5)	Ref. value	NA	NA			
Housing conditions	328	Multi-cat	189	58 (30.7)	1.14	0.70–1.84	0.606			
		Single-cat	139	39 (28.1)	Ref. value	NA	NA			
Cattery/cat show	257	No	236	72 (30.5)	1.10	0.41–2.94	0.853			
		Yes	21	6 (28.6)	Ref. value	NA	NA			
Exposure risk	283	Low	133	48 (36.1)	1.79	1.07–2.99	0.026			
		High	150	36 (24.0)	Ref. value	NA	NA			
Health status	350	Healthy	33	12 (36.4)	Ref. value	NA	NA			
		Acutely ill	127	35 (27.6)	0.66	0.30–1.50	0.324			
		Chronically ill	190	56 (29.5)	0.73	0.34–1.59	0.429			
Duration of disease	300	0–4 weeks	125	33 (26.4)	Ref. value	NA	NA			
		4 weeks to 1 year	83	26 (31.3)	1.27	0.69–2.34	0.441			
		1–3 years	53	18 (34.0)	1.43	0.72–2.87	0.309			
		≥ 3 years	39	9 (23.1)	0.84	0.36–1.95	0.678			
Chronic kidney disease	350	Yes	41	17 (41.5)	1.84	0.94–3.59	0.072	2.99	1.07–8.35	0.037
		No	309	86 (27.8)	Ref. value	NA	NA	Ref. value	NA	NA
Diabetes mellitus	350	Yes	20	6 (30.0)	1.03	0.38–2.76	0.954			
		No	330	97 (29.4)	NA	NA	NA			
Neoplasia	350	Yes	50	23 (46.0)	2.34	1.27–4.32	0.005	3.02	1.31–7.00	0.010
		No	300	80 (26.7)	Ref. value	NA	NA	Ref. value	NA	NA
FIV	74	Negative	67	16 (23.9)	1.88	0.21–16.82	1.000			
		Positive	7	1 (14.3)	Ref. value	NA	NA			
Glucocorticoid therapy	348	Yes	21	11 (52.4)	2.90	1.19–7.05	0.015	4.25	1.31–13.78	0.016
		No	327	90 (27.5)	Ref. value	NA	NA	Ref. value	NA	NA
Duration of glucocorticoid therapy	21	≥ 11 weeks	14	10 (71.4)	15.00	1.34–167.64	0.024			
		< 11 weeks	7	1 (14.3)	Ref. value	NA	NA			
Time since last vaccination	235	0–1 year	121	26 (21.5)	Ref. value	NA	NA			
		1–3 years	71	19 (26.8)	1.34	0.66–2.64	0.406			
		3–7 years	18	8 (44.4)	2.82	1.05–8.15	0.040			
		≥ 7 years	25	12 (48.0)	3.37	1.38–8.27	0.008			
Vaccination status	313	Not vaccinated	28	20 (71.4)	6.75	2.86–15.97	<0.001	24.75	6.73–91.08	<0.001
		Vaccinated	285	77 (27.0)	Ref. value	NA	NA	Ref. value	NA	NA

NA, not applicable; Ref. value, reference value indicating the category used as the base line for comparison for each variable.

Please cite this article in press as: Mende, K., et al. Prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in client-owned cats in Southern Germany. The Veterinary Journal (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.12.023>

exposure based on presence of the virus in the environment can contribute to different prevalences. A high environmental contamination might explain the results for the population reported from Costa Rica (Blanco et al., 2009). Furthermore, cats can also be infected by canine parvovirus (CPV) 2a, 2b, and 2c (Clegg et al., 2012; Decaro et al., 2010, 2011) and because of cross-reactions, antibodies against CPV cannot be distinguished from antibodies against FPV (Nakamura et al., 2001). As CPV infection is common in Costa Rica (Blanco et al., 2009), the high prevalence of antibodies in cats in Costa Rica could, at least partially, be due to infection with CPV. Finally, different methods of antibody testing (ELISA vs. HI) with different sensitivities could account for some differences in the reported prevalences, although HI is generally accepted as the gold-standard for the detection of antibodies against FPV and has been used in most prevalence studies (Lappin et al., 2002; DiGangi et al., 2012).

The presence of antibodies associated with vaccination status was as expected in our study. However, there were several unexpected findings. Firstly, eight cats (28.6%) that had never been vaccinated had antibodies. Of these, four currently had outdoor access and one had previously had outdoor access, so for these five cats natural exposure from the environment is most likely. One cat was a kitten less than 20 weeks old and the presence of MDA could be an explanation for antibody detection. Another cat was presented with signs of cerebellar hypoplasia, and panleukopenia of the dam during pregnancy can be suspected. For the third remaining indoor cat, no obvious explanation could be identified, although contact with dogs infected with CPV or a CPV-contaminated environment are reasonable explanations.

Secondly, 11/47 cats (23.4%) that had been vaccinated according to current guidelines had no antibodies. Three of these cats were between 2 and 7 years old, four cats were between 7 and 12 years, and another four were older than 12 years. Interference with MDA lasting longer than 16 weeks with failure of the administered vaccine to overcome passive immunity is a likely explanation. One recent study showed that MDA can last up to 20 weeks of age and that even low MDA titres can inhibit the development of antibodies (Jakel et al., 2012). In that study, MDA interfered with vaccinations at 8, 12 and 16 weeks of age, and despite triple vaccination, 36.7% of the kittens did not develop antibodies (Jakel et al., 2012).

Thirdly, 8/18 cats (44.4%) that had their last vaccination between 3 and 7 years previously, had no antibodies. That is a surprising finding, because the duration of immunity (DOI) is supposed to last for at least 7 years based on challenge experiments in specific-pathogen-free (SPF) cats (Scott and Geissinger, 1999). Potentially, the cats in the present study never developed antibodies, or perhaps the DOI of FPV is shorter in some field cats than is presently suspected. It is uncertain whether these cats are protected despite a lack of antibodies, since SPF kittens without detectable antibodies can resist experimental viral challenge probably due to a cell-mediated immune response (Lappin et al., 2002).

An interesting finding in the current study was a lack of antibodies associated with CKD. An association between CKD and reduced antibody development following vaccination has been described in humans. For example, antibody development after vaccination against hepatitis B decreases in advanced stages of CKD in humans (Agarwal et al., 1999). Furthermore, kidney function as measured by glomerular filtration rate (GFR) predicts antibody response after vaccination, since a rise of antibody titres after vaccination becomes increasingly unlikely as GFR decreases (Agarwal et al., 1999; DaRoza et al., 2003). Malnutrition in patients with CKD is suspected to be associated with an impaired immune response (Lombardi et al., 1992) and chronic uremia, directly or indirectly, alters immune cell function (Pesanti, 2001). Consequently, a generalized immunosuppression and decreased antibody development are present in CKD patients.

Neoplasia was also associated with a lack of antibodies in the current study. No information on responses to vaccination in tumour patients exists in veterinary medicine, but a recently published meta-analysis in humans indicated lower rates of antibody development after vaccination in tumour patients (Beck et al., 2012). Generalized immunosuppression in cancer patients is caused by a complex network of different tumour-derived factors with immunosuppressive function (Kim et al., 2006).

Finally, glucocorticoid therapy was also associated with a lack of antibodies. One study investigated the effect of oral prednisolone on vaccination against canine distemper virus in Beagle puppies and found that doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg over a period of 21 days had no effect on the response to vaccination (Nara et al., 1979). In the present study, 52.4% of the cats that received glucocorticoids had no antibodies against FPV. Cats receiving glucocorticoids for at least 11 weeks were particularly at risk.

Several factors were not associated with a lack of antibodies. The initial suspicion that breed could be an associated factor was based on several outbreaks of FPV in vaccinated breeding catteries of NFC that were reported by the Paul-Ehrlich-Institut in Germany in 2008 and 2009 (Hoffmann et al., 2010). A subsequent field study did not find a significant difference in antibody development between NFC and European short hair cats (Jakel et al., 2012). The present study confirmed that breed is not a factor associated with a lack of antibody generation. Sex as well as neutering status also were not associated with a lack of antibodies. However, an unexpected finding was that the prevalence of antibodies was not associated with age. Older cats were expected to have antibodies due to frequent vaccinations and potential natural exposure, and an increasing prevalence of antibodies in older cats has previously been reported (Scott and Geissinger, 1999; Hellard et al., 2011).

There were several limitations to this study. First, the validity of historical data (e.g. date of birth) depended on the information provided by the owner. Second, only cats presented to the clinic were included and so the population was preselected and cannot be regarded as a representative sample of the whole population. Third, this study determined antibody prevalence as an equivalent for protection. However, some cats might have been protected (e.g. after vaccination) without detectable antibodies. In challenge experiments some cats without antibodies can be protected against infection and protection in these cats is assumed to be caused by cell mediated immunity (Lappin et al., 2002).

Conclusions

About one-third of the cats in the current study had no antibodies against FPV, CKD, neoplasia, and long-term glucocorticoid therapy were significantly associated with a lack of antibodies against FPV. Although vaccination status was associated with a lack of antibodies, a certain number of 'properly' vaccinated cats had no antibodies, while some unvaccinated cats had antibodies probably due to natural exposure. Based on these findings, antibody titre measurement is recommended in order to determine individual immune status as part of an annual health check, especially in cats with chronic diseases or those receiving long-term glucocorticoid therapy.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

ARTICLE IN PRESS

K. Mende et al./The Veterinary Journal xxx (2014) xxx–xxx

5

Acknowledgements

We thank Professor Dr. Andrea Meyer-Lindenberg for providing sera that were collected from cats from the Clinic of Small Animal Surgery and Gynaecology of the Ludwig-Maximilians-Universität, during sample period. We thank Professor Dr. Ralf S. Mueller (Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität) for very helpful discussions concerning study design and for his critical review of the manuscript. Preliminary results were presented as an abstract at the 21st Internal Medicine and Clinical Pathology Conference of the German Veterinary Association (DVG), Munich, February, 2013, and at the 23rd Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine, Companion Animals (ECVIM-CA), Liverpool, September, 2013.

References

- Agarwal, S.K., Irshad, M., Dash, S.C., 1999. Comparison of two schedules of hepatitis B vaccination in patients with mild, moderate and severe renal failure. *Journal of the Association of Physicians of India* 47, 183–185.
- Barker, I.K., Povey, R.C., Voigt, D.R., 1983. Response of mink, skunk, red fox and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence of antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47, 188–197.
- Beck, C.R., McKenzie, B.C., Hashim, A.B., Harris, R.C., Nguyen-Van-Tam, J.S., 2012. Influenza vaccination for immunocompromised patients: Systematic review and meta-analysis by aetiology. *Journal of Infectious Diseases*, 1–10.
- Blanco, K., Prendas, J., Cortes, R., Jimenez, C., Dolz, G., 2009. Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 661–663.
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R.M., Radford, A.D., 2012. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Veterinary Microbiology* 157, 78–85.
- DaRoza, G., Loewen, A., Djurdjev, O., Love, J., Kempston, C., Burnett, S., Kiali, M., Taylor, P.A., Levin, A., 2003. Stage of chronic kidney disease predicts seroconversion after hepatitis B immunization: Earlier is better. *American Journal of Kidney Diseases* 42, 1184–1192.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., 2010. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 51, 1–32.
- Decaro, N., Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Parisi, A., Terio, V., Elia, G., Lucente, M.S., Cavalli, A., et al., 2010. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Research in Veterinary Science* 89, 275–278.
- Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., Losurdo, M., Colaianni, M.L., Greco, M.F., Buonavoglia, C., 2011. Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13, 231–236.
- DiGangi, B.A., Levy, J.K., Griffin, B., McGorray, S.P., Dubovi, E.J., Dingman, P.A., Tucker, S.J., 2012. Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus 1, and feline calicivirus in cats entering a Florida animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241, 1320–1325.
- Fawcett, T., 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 27, 861–874.
- Franchini, M., 1990. Die Tollwutimpfung von mit Felinem Leukämivirus infizierten Katzen (Rabies vaccination in cats infected with feline leukemia virus). *Veterinary Dissertation, Dr. med. vet., University of Zurich, Zurich, Switzerland*.
- Hellard, E., Fouchet, D., Santin-Janin, H., Tarin, B., Badol, V., Coupier, C., Leblanc, G., Poulet, H., Pontier, D., 2011. When cats' ways of life interact with their viruses: A study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Preventive Veterinary Medicine* 101, 250–264.
- Hoffmann, A., Schönborn, E., Mergel, A., Cuflier, K., 2010. Pharmakovigilanzreport Tierimpfstoffe, Analyse der im Jahr 2008 und 2009 im Paul-Ehrlich-Institut eingegangenen Meldungen (Pharmacovigilance report veterinary vaccines 2008/2009). *Deutsches Tierärzteblatt* 6, 766–775.
- Hosie, M.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., et al., 2009. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 575–584.
- Jakel, V., Cussler, K., Hanschmann, K.M., Truyen, U., König, M., Kamphuis, E., Duchow, K., 2012. Vaccination against Feline Panleukopenia: Implications from a field study in kittens. *BMC Veterinary Research* 8, 62.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., 2006. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: Beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 119, 254–264.
- Kruse, B.D., Unterer, S., Horlacher, K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2010. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1271–1276.
- Lappin, M.R., Andrews, J., Simpson, D., Jensen, W.A., 2002. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220, 38–42.
- Lombardi, M., Pizzarelli, F., Righi, M., Cerri, T., Dattolo, P., Nigrelli, S., Michelassi, S., Sica, S., Alecci, A., Di Geronimo, P., et al., 1992. Hepatitis B vaccination in dialysis patients and nutritional status. *Nephron* 61, 266–268.
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., et al., 2009. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 565–574.
- Mouzin, D.E., Lorenzen, M.J., Haworth, J.D., King, V.L., 2004. Duration of serologic response to three viral antigens in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224, 61–66.
- Nakamura, K., Ikeda, Y., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mochizuki, M., 2001. Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses. *Research in Veterinary Science* 71, 219–222.
- Nara, P.L., Krakowka, S., Powers, T.E., 1979. Effects of prednisolone on the development of immune responses to canine distemper virus in beagle pups. *American Journal of Veterinary Research* 40, 1742–1747.
- Parrish, C.R., Carmichael, L.E., 1983. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. *Virology* 129, 401–414.
- Pesanti, E.L., 2001. Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infectious Disease Clinics of North America* 15, 813–832.
- Richards, J.R., Elston, T.H., Ford, R.B., Gaskell, R.M., Hartmann, K., Hurley, K.F., Lappin, M.R., Levy, J.K., Rodan, I., Scherck, M., et al., 2006. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel report. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, 1405–1441.
- Scott, F., 1987. Viral diseases. Panleukopenia. In: *Diseases of the Cat: Medicine and Surgery*. WB Saunders, Philadelphia, PA, pp. 182–193.
- Scott, F.W., Csiza, C.K., Gillespie, J.H., 1970a. Feline viruses. IV. Isolation and characterization of feline panleukopenia virus in tissue culture and comparison of cytopathogenicity with feline picornavirus, herpesvirus, and reovirus. *Cornell Veterinarian* 60, 165–182.
- Scott, F.W., Csiza, C.K., Gillespie, J.H., 1970b. Maternally derived immunity to feline panleukopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 156, 439–453.
- Scott, F.W., Geissinger, C.M., 1999. Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *American Journal of Veterinary Research* 60, 652–658.
- Ständige Impfkommission Veterinär (Standing Committee on Vaccination Vet.), 2013. Leitlinie zur Impfung von Kleintieren (Vaccination Guidelines for Small Animals). *Deutsches Tierärzteblatt* 7.
- Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., et al., 2009. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 1, 538–546.

IV. STUDIE 2

Evaluation of an in-house dot enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against feline panleukopenia virus

Katherina Mende¹

Bianca Stuetzer¹, Dr. med. vet.

Uwe Truyen², Prof. Dr. med. vet. habil.

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet of Munich, Germany

² Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany

Journal of Feline Medicine and Surgery, veröffentlicht

Journal of Feline Medicine and Surgery (February 2014):

doi 10.1177/1098612X14520812

Original Article



Evaluation of an in-house dot enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against feline panleukopenia virus

Journal of Feline Medicine and Surgery
1–6

© ISFM and AAFP 2014

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1098612X14520812

jfms.com



Katherina Mende¹, Bianca Stuetzer¹, Uwe Truyen²
and Katrin Hartmann¹

Abstract

Measuring antibody titres to determine a cat's immunity to core diseases instead of just administering annual vaccinations has not been established in Germany so far. An in-house test kit for the detection of antibodies against feline panleukopenia virus (FPV), feline herpesvirus-1 and feline calicivirus – the ImmunoComb Feline VacciCheck – is now available in several European countries. The aim of this study was to assess the quality of the ImmunoComb Feline VacciCheck to determine antibodies by comparing it to a gold standard. The test is aimed for use in practice to assist decision-making when performing an individual health assessment to see whether a cat is potentially unprotected against FPV and requires FPV vaccination. Sera from 347 cats were included in the study. For antibody detection, haemagglutination inhibition (HI) was performed as gold standard. Sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of the ImmunoComb Feline VacciCheck were determined for three different HI titre cut-off points (1:20, 1:40, 1:80). In comparison to the HI, the ImmunoComb Feline VacciCheck showed a sensitivity of 79%, 83% and 87%, and a specificity of 89%, 86% and 81%, respectively. Specificity of the ImmunoComb Feline VacciCheck, which was considered the most important parameter, was acceptable in comparison to HI. Especially when considering an antibody titre of 1:20 sufficient for protection (eg in an adult animal), the ImmunoComb Feline VacciCheck can be recommended for use in veterinary practice.

Accepted: 26 December 2013

Introduction

Feline panleukopenia virus (FPV) is a single-stranded DNA virus of the family Parvoviridae and the genus *Parvovirus*. All members of Felidae and cats of all ages can be infected.^{1,2} Owing to high morbidity and high mortality of the infection, the FPV vaccine is considered a core vaccine, and current guidelines on vaccination recommend vaccinating as often as necessary, but not more than necessary. Experts recommend vaccinating kittens every 3–4 weeks up to 16 weeks of age followed by a booster vaccination after 1 year and further vaccinations on a triennial basis.^{3–6} In a population in which the virus is still endemic, many cats are likely to have antibodies and be protected either because of exposure or vaccination. As the presence of antibodies is considered to indicate protection from disease, antibody testing can be used to determine protection or susceptibility of individual cats. Furthermore, it can be used to evaluate the immune response after vaccination and the efficacy of vaccines in

experimental settings.^{7–10} Titre testing to determine whether a cat has specific antibodies against FPV is a useful tool in individualised medicine. However, it has so far not been established in Germany. Its major aim in small animal practice is to determine whether a cat is potentially unprotected against FPV and requires FPV vaccination. Thus, using titre testing instead of just vaccinating a potentially protected cat can prevent over-vaccination in

¹Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany

²Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Corresponding author:

Katherina Mende, Veterinarian, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Email: katherina.mende@googlemail.com

the adult cat population. Haemagglutination inhibition (HI) is considered to be the gold standard of measuring antibodies against FPV,^{8,11,12} but the HI titre cut-off point to predict protection is still debated, and different studies consider different HI titre cut-off points as protective.^{8,13,14} While titre determination by HI in a commercial laboratory is time-consuming, an in-house test that provides rapid and reliable results would be useful in everyday practice. Very recently, an in-house test arrived on the German market. The test detects antibodies against FPV, feline herpesvirus-1 (FHV-1) and feline calicivirus (FCV) (ImmunoComb Feline VacciCheck; Biogal). One study investigated the performance of this test in detecting FPV antibodies in young, presumed unvaccinated cats entering a shelter in Florida, USA.¹⁴ Since then, the test has been modified in an aim to increase sensitivity. So far, no study has evaluated this modified antibody in-house test in a diverse population of cats in Europe that included cats of different origin, source area, environment, housing conditions, and health and vaccination status.

Thus, the aims of this study were to evaluate the ImmunoComb Feline VacciCheck in the field by comparing the FPV results to those of the HI (gold standard) using different HI titre cut-off points (1:20, 1:40, 1:80) by measuring sensitivity, specificity, and positive (PPVs) and negative predictive values (NPVs), and furthermore to evaluate the practicability of the test. FHV-1 and FCV results were not evaluated.

Materials and methods

Cats

The study was designed as a prospective cross-sectional study. All cats ($n = 347$) that were presented from December 2011 to June 2012 to the Clinic of Small Animal Medicine and to the Clinic of Small Animal Surgery and Gynaecology of the Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany, and that needed a blood sample for preventive health assessment or for diagnostic purposes in sick animals, were included in the study. Blood was collected by venepuncture of the vena cephalica antebrachii, vena saphena, or vena jugularis. For data collection, medical records were studied and missing data were collected via a structured telephone interview. Cats were excluded if there were no historical data available (ie, in stray cats). The study protocol was approved by the ethics committee of the Centre for Veterinary Clinical Medicine, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany (licence number 3-5-10-2012).

ImmunoComb Feline VacciCheck

After blood sampling, sera were directly separated by centrifugation and stored at -20°C until processed. All samples were analysed with the ImmunoComb Feline VacciCheck according to manufacturer's instructions. Each antibody test kit contained a comb-shaped plastic

card and a multi-compartment developing plate for testing 12 sera in parallel (Figure 1). The manufacturer declares that the positive control of the test would be equivalent to an antibody titre of 1:80 in HI. The test is based on an enzyme-linked immunosorbent assay principle and detects antibodies against FPV, FHV-1 and FCV (FHV-1 and FCV results were not part of this study). After stepwise washing and binding of an enzyme-linked anti-cat immunoglobulin G antibody, a grey colour tone developed in the last step. A colour tone equal to or darker than the positive control was regarded as a positive result; a colour tone paler than the positive control was regarded as a negative result.

HI

All samples were analysed by the gold standard HI. HI is a laboratory test to measure antibodies against FPV. As FPV agglutinates swine erythrocytes, antibodies present in the sample prevent attachment of the virus to these erythrocytes and therefore inhibit haemagglutination. Samples underwent heat inactivation (56°C for 30 mins), were diluted with borate buffered saline (BBS) 1:5 and then pre-adsorbed to 15 μl of a 50% suspension of swine erythrocytes in phosphate buffered saline (PBS) for 1 h at 4°C . After centrifugation for 5 mins, the supernatant was subsequently two-fold diluted serially over 12 steps beginning at 1:10 in 96-well V-bottomed plates (Greiner Bio-One). Eight haemagglutinating units of FPV-b (strain 292, as used and described in previous studies^{15,16}) in BBS were added to each well and incubated for 1 h at room temperature. Then, a 0.5% suspension of swine erythrocytes in PBS was added and incubated at 4°C

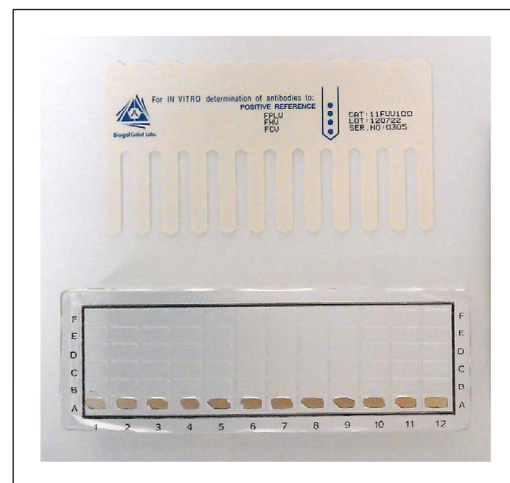


Figure 1 ImmunoComb Feline VacciCheck antibody test kit containing a comb-shaped plastic card and a multi-compartment developing plate

overnight. The reciprocal of the highest dilution of serum that inhibited haemagglutination was defined as the HI titre of the serum. Different antibody titres were used as HI titre cut-off points for a positive result (1:20, 1:40, 1:80).

Statistical analysis

For test evaluation, the following performance parameters were calculated using a 2×2 contingency table: sensitivity, specificity, PPV and NPV. To quantify uncertainty, 95% confidence intervals (CIs) were calculated. The prevalence (and 95% CI) was calculated as the proportion of positive results of the total number of tested sera. Performance parameters and prevalences were calculated for three different HI titre cut-off points (1:20, 1:40, 1:80). Statistical analysis was performed using commercial software (SPSS).

For evaluation of the diagnostic performance specificity was set as the most important parameter. As a predefined criterion, a specificity of $\geq 90\%$ was considered a good performance, a specificity of 80–90% was set as acceptable, and a specificity of $< 80\%$ was considered as unacceptable for recommendation of the test.

Results

Study population

Cats in the study were of a variety of breeds, female ($n = 149$) or male ($n = 198$), neutered ($n = 306$) or sexually intact ($n = 41$). The median age was 9 years and ranged from 6 weeks to 20 years. Cats came from private households ($n = 140$), animal shelters ($n = 41$), breeders ($n = 30$), foreign countries ($n = 59$) or were formerly stray cats ($n = 30$) (origin). Cats lived in either urban ($n = 298$) or rural communities ($n = 49$) (source area) and were kept indoors ($n = 194$) or outdoors ($n = 133$) (environment), as a single cat ($n = 138$) or in multi-cat households ($n = 187$) (housing conditions). At the time of presentation, cats were healthy ($n = 33$), or acutely ($n = 127$) or chronically ill ($n = 187$) (health status). Most cats had a history of prior vaccination ($n = 282$). Twenty-eight cats had never been vaccinated.

Sensitivity, specificity and predictive values

The results of all sera tested with the ImmunoComb Feline VacciCheck compared to HI are shown in Table 1. For the three different HI titre cut-off points (1:20, 1:40, 1:80), the test showed 9, 14 and 23 false-positive results, respectively. Specificities of the ImmunoComb Feline VacciCheck were 89%, 86% and 81%, respectively (Table 2).

Prevalence

Prevalence of antibodies against FPV, when considering a HI titre cut-off point of 1:20, 1:40 or 1:80 as positive, was 77% (267/347), 71% (245/347) and 65% (225/347),

Table 1 Results of all 347 sera in the ImmunoComb Feline VacciCheck compared to haemagglutination inhibition (HI) as gold standard for three different HI titre cut-off points (1:20, 1:40, 1:80)

	ImmunoComb negative	ImmunoComb positive	Total
HI negative ($< 1:20$)	71	9	80
HI positive ($\geq 1:20$)	58	209	267
HI negative ($< 1:40$)	88	14	102
HI positive ($\geq 1:40$)	41	204	245
HI negative ($< 1:80$)	99	23	122
HI positive ($\geq 1:80$)	30	195	225
Total	129	218	347

respectively (Table 2). Antibody prevalence measured by the ImmunoComb Feline VacciCheck was 63% (218/347; 95% CI 58–68).

Practicability of the ImmunoComb Feline VacciCheck

All 347 sera showed valid results in the ImmunoComb Feline VacciCheck and could clearly be classified as positive or negative. Twelve sera could be processed in parallel. The test always delivered results in 21 mins, as described in the manufacturer's instruction manual.

Discussion

FPV is a frequent disease that occurs in young and old cats.² In a retrospective study that investigated prognostic factors for survival of cats with panleukopenia, 244 cats that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany, were diagnosed with FPV between 1990 and 2007.² According to current guidelines, ideally, all cats should be protected against FPV infection at any time, if not through immunity following natural infection, then by vaccination.^{3–6} Although rare in cats, mild-to-severe adverse events after vaccination occur; these include feline injection-site sarcomas (FISS) that often recur after surgery and have a guarded prognosis.^{17–19} FISS occur more commonly after adjuvanted inactivated vaccines,¹⁹ but have also been described after vaccination against FPV, FHV-1 and FCV.²⁰ As immunological protection against FPV is long-lived,²¹ vaccination should ideally only be performed in animals that are unprotected.

In adult vaccinated cats, regardless of vaccine type or vaccination interval, or cats that overcame infection, detection of FPV-specific antibodies is predictive of protection. Thus, measurement of antibodies against FPV can be used to assess the immune status in these cats.^{8,9,21} A fast and reliable in-house test would be an excellent tool for veterinarians to perform modern individualised medicine and avoid over-vaccination.

Table 2 Performance parameters of the ImmunoComb Feline VacciCheck based on results given in Table 1: sensitivity, specificity, and positive (PPV) and negative predictive value (NPV) (and 95% confidence interval [CI]), calculated using haemagglutination inhibition (HI) at three different HI titre cut-off points (1:20, 1:40, 1:80) as gold standard

HI titre cut-off point	Antibody prevalence in % (95% CI)	Sensitivity in % (95% CI)	Specificity in % (95% CI)	PPV in % (95% CI)	NPV in % (95% CI)
1:20	77 (73–83)	78 (73–83)	89 (82–96)	96 (93–99)	55 (46–64)
1:40	71 (66–75)	83 (79–88)	86 (80–93)	94 (90–97)	68 (60–76)
1:80	65 (60–70)	87 (82–91)	81 (74–88)	89 (85–94)	77 (69–84)

The intended use of the test evaluated in this study is to assess the specific immune status of cats by detecting antibodies, either before or after regular vaccinations in veterinary practice. When evaluating a test, samples should be representative for the intended use of the test.²² Thus, a diverse population of cats that mimics the actual population in a small animal practice regarding signalment, origin, source area, environment, housing conditions, and health and vaccination status was chosen in the present study. However, this clinic population cannot be assumed to be representative for the national cat population.

In this study, 347 sera were analysed. Prevalence of antibodies against FPV was 77%, 71% and 65%, depending on the chosen HI titre cut-off point. Similar FPV antibody prevalences were described in 267 client-owned cats in the USA (67%).⁸ A remarkably lower antibody prevalence was found in cats entering a Florida (USA) animal shelter (40%). In that study, 67% of the cats entering the shelter were stray cats. In these cats, a low vaccination rate is the most reasonable explanation for the low antibody prevalence at the time of blood sampling. In addition, differences in environmental exposure to FPV can be a reason for the different prevalences.

For the detection of antibodies against FPV, HI served as the gold standard in this study.^{8,11,12} The method is very specific for the virus, and the technique is simple and well established. In addition, equipment and reagents are quite inexpensive. However, this test cannot be performed in practice. Another limitation of the method is that reading the plate is subjective, which could lead to false-positive or false-negative results. However, to minimise subjective evaluation, HI plates were read by two independent people: one was the first author (KM) and one was an experienced laboratory technician. Divergent results were checked by a second laboratory technician.

Specificity was set as the most important parameter in this study. For use in the context of an individual health assessment and as a tool for deciding whether a cat needs vaccination, it is essential to obtain a low number

of false-positive test results, so that potentially unprotected cats can be identified.

The manufacturer of the ImmunoComb Feline VacciCheck declares a HI titre cut-off point of $\geq 1:80$ as a positive result. However, when considering a HI titre cut-off point of 1:80 as a positive result, the specificity of the ImmunoComb Feline VacciCheck in this study would only be 81%. There was a relatively high number (23) of false-positive test results. The PPV was still relatively high (89%), which, however, is influenced by the high antibody prevalence in this study. According to the predefined criterion, the specificity of the test was not good when basing the result on a HI titre cut-off point of 1:80. This specificity would be remarkably lower than those described previously for the ImmunoComb Feline VacciCheck, for example, in the shelter study in Florida, USA (99%),¹⁴ and in the manufacturer's product information (98%). On the contrary, the sensitivity of the test (87%) was higher than in the shelter study in Florida (49%),¹⁴ but not as good as declared by the manufacturer (90%). In this study, 30 sera tested false-negative. False-negative results, however, are not as problematic as false-positive results. Cats with false-negative test results will receive a booster vaccination even if they are protected against infection at the time of blood sampling. The difference between test results in the shelter study and the present study, as well as the declaration by the manufacturer concerning sensitivity and specificity, could be due to recent modifications to the test by the manufacturer.

It is still debated which antibody titre is equivalent to protection in adult cats. In former studies, even lower ($<1:80$) antibody titres were considered to be predictive for protection against FPV infection in cats that were formerly vaccinated or who had overcome infection.^{13,23} In one study, cats were considered to be protected against infection with FPV if they had a titre of $\geq 1:40$ in HI before vaccination.¹³ Considering a HI titre cut-off point of 1:40 as protective, the specificity of the ImmunoComb Feline VacciCheck in this study would be 86%.

At present, however, the presence of antibodies even at a low concentration (such as titres of 1:20) is considered protective in cats that have been vaccinated after maternally derived antibodies have dropped, or in cats that have overcome infection, as these indicate a response of the immune system to an antigen.^{8,24,25} In challenge experiments, the presence of antibody titres of 1:20 in previously vaccinated cats was predictive for protection against disease.⁸ When basing the results of the present study on a HI titre cut-off point of 1:20, specificity of the ImmunoComb Feline VacciCheck was 89% and thus almost reached the predefined criterion for a good test performance. Based on this HI titre cut-off point, the test showed a low number (nine) of false-positive results, which is important in helping to decide whether a cat requires FPV vaccination.

The test has some benefits concerning the practicability compared with titre testing at a laboratory. As the test can be performed in about 21 mins, results are available during consultation and can be used immediately for decision-making. Furthermore, up to 12 samples can be processed in parallel. Another advantage is the low amount of blood required. The test just requires 5 µl of serum or plasma, or 10 µl of whole blood, whereas for HI only serum can be used and at least 100 µl is needed.

As FHV-1 and FCV results were not evaluated in this study, no recommendation can be given about the test's usefulness in determining FHV-1 and FCV antibodies in the field of small animal practice.

One limitation of the study is that the amount of antibodies indicating protection is still unclear. A true protection can only be determined by challenge experiments, which, of course, was not possible in this study with privately owned cats.

Conclusion

The ImmunoComb Feline VacciCheck showed a high specificity to detect antibodies against FPV. When considering an antibody titre of 1:20 in HI to be protective, the test almost reached the predefined criterion of 90% (89%) for a good performance and at least delivered acceptable results. Thus, the test can be recommended for use in veterinary practice to help in deciding whether a cat requires FPV vaccination. However, further modification by the manufacturer aiming for an even higher specificity of the test would be desirable to reduce the risk of missing and not vaccinating unprotected cats.

Acknowledgements We thank Biogal Galed Laboratories, Kibbutz Galed, Israel, for selling the test at a reduced price. Furthermore, we thank Professor Dr Andrea Meyer-Lindenberg for her consent to use sera that were collected from patients of the Clinic of Small Animal Surgery and Gynaecology of the Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany.

Conflict of interest The authors do not have any potential conflicts of interest to declare.

Funding This research received no grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

References

- 1 Scott F. **Viral diseases. Panleukopenia.** In: Holzwurm J (ed). *Diseases of the Cat: Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders, 1987, pp 182–193.
- 2 Kruse BD, Unterer S, Horlacher K, et al. **Prognostic factors in cats with feline panleukopenia.** *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1271–1276.
- 3 Day MJ, Horzinek MC and Schultz RD. **WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats.** *J Small Anim Pract* 2010; 51: 1–32.
- 4 Truyen U, Addie D, Belak S, et al. **Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management.** *J Feline Med Surg* 2009; 1: 538–546.
- 5 Richards JR, Elston TH, Ford RB, et al. **The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel report.** *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229: 1405–1441.
- 6 Ständige Impfkommision Vet [Standing Committee on Vaccination Vet] **Leitlinie zur Impfung von Kleintieren [Vaccination guidelines for small animals].** *Deutsches Tierärzteblatt* 2013; 7.
- 7 Schultz RD, Ford RB and Olsen J. **Titer testing and vaccination: A new look at traditional practices.** *Vet Med* 2002; 97: 1–13.
- 8 Lappin MR, Andrews J, Simpson D, et al. **Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats.** *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 38–42.
- 9 Tizard I and Ni Y. **Use of serologic testing to assess immune status of companion animals.** *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 54–60.
- 10 Scott FW and Geissinger CM. **Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine.** *Am J Vet Res* 1999; 60: 652–658.
- 11 Johnson RH. **Serologic procedures for the study of feline panleukopenia.** *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158 (Suppl 2): 876.
- 12 Jakel V, Cussler K, Hanschmann KM, et al. **Vaccination against feline panleukopenia: implications from a field study in kittens.** *BMC Vet Res* 2012; 8: 62.
- 13 Mouzin DE, Lorenzen MJ, Haworth JD, et al. **Duration of serologic response to three viral antigens in cats.** *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 61–66.
- 14 DiGangi BA, Gray LK, Levy JK, et al. **Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA.** *J Feline Med Surg* 2011; 13: 912–918.
- 15 Parrish CR and Carmichael LE. **Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus.** *Virology* 1983; 129: 401–414.
- 16 Scott FW, Csiza CK and Gillespie JH. **Feline viruses. IV. Isolation and characterization of feline panleukopenia virus in tissue culture and comparison of cytopathogenicity with feline picornavirus, herpesvirus, and reovirus.** *Cornell Vet* 1970; 60: 165–182.

- 17 Moore GE and HogenEsch H. **Adverse vaccinal events in dogs and cats.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 393–407.
- 18 McEntee MC and Page RL. **Feline vaccine-associated sarcomas.** *J Vet Intern Med* 2001; 15: 176–182.
- 19 Srivastav A, Kass PH, McGill LD, et al. **Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats.** *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 595–602.
- 20 De Man MM and Ducatelle RV. **Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination.** *J Feline Med Surg* 2007; 9: 432–434.
- 21 Scott FW and Geissinger CM. **Duration of immunity in cats vaccinated with an inactivated feline panleukopenia, herpesvirus, and calicivirus vaccine.** *Feline Pract* 1997; 25: 12–19.
- 22 Polzin D, Lund E, Walter P, et al. **From journal to medicine: evidence based medicine.** In: Bonagura J (ed). *Kirk's current veterinary therapy*. 13th ed. Philadelphia: Saunders, 1999, pp 2–8.
- 23 Reese MJ, Patterson EV, Tucker SJ, et al. **Effects of anesthesia and surgery on serologic responses to vaccination in kittens.** *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 116–121.
- 24 Lappin MR. **Feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1 and feline calicivirus antibody responses in seronegative specific pathogen-free kittens after parenteral administration of an inactivated FVRCP vaccine or a modified live FVRCP vaccine.** *J Feline Med Surg* 2012; 14: 161–164.
- 25 Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM, et al. **A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleukopenia virus in 6-week-old kittens.** *J Feline Med Surg* 2001; 3: 17–22.

V. DISKUSSION

Nationale und internationale Expertengruppen empfehlen in ihren Leitlinien zur Impfung von Kleintieren, dass jede Katze zu jedem Zeitpunkt vor einer feline Panleukopenie geschützt sein sollte, entweder durch das Überstehen einer natürlichen Infektion oder durch eine erfolgreiche Impfung. Damit gehört die Impfung gegen FPV zu den sogenannten „Core-Impfungen“ der Katze. Derzeit lautet die Empfehlung, Katzenwelpen alle drei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen, gefolgt von einer Impfung nach weiteren zwölf Monaten und anschließend alle drei Jahre zu impfen (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013). Dennoch kommt die Erkrankung, welche durch eine hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet ist, sowohl bei jungen als auch bei ausgewachsenen Katzen häufig vor (KRUSE et al., 2010). Derzeit ist nicht bekannt, wie gut die Katzenpopulation in Deutschland vor Infektionen mit FPV geschützt ist. Auch gibt es bislang keine Studien, die untersucht haben, ob es innerhalb der Population Katzen gibt, die ein erhöhtes Risiko haben, nicht vor Infektionen geschützt zu sein.

Der Nachweis von Antikörpern gilt bei geimpften ausgewachsenen Katzen und auch bei Katzen, die bereits eine natürliche Infektion überstanden haben, als prognostisch für den Schutz vor einer Infektion mit FPV. Daher kann die Messung von Antikörpern gegen FPV genutzt werden, um den individuellen Immunstatus bei Katzen zu bestimmen (SCOTT & GEISSINGER, 1997; TIZARD & NI, 1998; LAPPIN et al., 2002).

Das Ziel der ersten Studie der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen FPV bei Katzen in Süddeutschland und die Ermittlung von Faktoren, die mit dem Fehlen von Antikörpern assoziiert sind. Dazu wurden Serumproben von 350 Katzen, die in der Zeit von Dezember 2011 bis Juni 2012 in der Medizinischen Kleintierklinik und in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen von Gesundheitschecks, zur Untersuchung auf Retrovirusinfektionen oder aufgrund von verschiedenen Problemen vorgestellt wurden, mittels HAH auf

Antikörper gegen FPV untersucht. Ein Antikörpertiter von $\geq 1:40$ galt in dieser Studie als positives Ergebnis (Cut-off).

In dieser ersten Studie waren bei 70,6 % (247/350) der Katzen Antikörper gegen FPV nachweisbar. Ein Drittel der Katzen (29,4 %; 103/350) war demnach zum Zeitpunkt der Vorstellung in den Kliniken wahrscheinlich nicht vor einer Infektion mit FPV geschützt und somit gefährdet, an feliner Panleukopenie zu erkranken. Vorangegangene vergleichbare Studien zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. So wurden in der Vergangenheit zum Teil sehr hohe Antikörperprävalenzen von bis zu 93 % (BLANCO et al., 2009), zum Teil Prävalenzen, die mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar waren (LAPPIN et al., 2002), zum Teil aber auch deutlich niedrigere Antikörperprävalenzen von 25 % (HELLARD et al., 2011) und 40 % (DIGANGI et al., 2012a) beschrieben. Unterschiedliches Impfverhalten und damit der Anteil der geimpften Katzen einer Population in den verschiedenen Ländern und Studienpopulationen könnten diese Unterschiede zum Teil erklären. So können niedrige Antikörperprävalenzen bei streunenden Katzen auf fehlende Impfungen zurückzuführen sein (HELLARD et al., 2011; DIGANGI et al., 2012a). In einer Studie von BLANCO und Mitarbeitern (2009) aus Costa Rica, in der eine sehr hohe Antikörperprävalenz von 93 % beobachtet wurde, waren jedoch nur 18 % der Katzen vorberichtlich geimpft. Damit wird die Antikörperprävalenz innerhalb einer Population neben der Impfung sehr wahrscheinlich auch durch die Häufigkeit einer natürlichen Exposition beeinflusst, welche wiederum vom Vorkommen des Virus in der Umwelt und von den Lebensumständen und Haltungsformen der Katzen abhängt (HELLARD et al., 2011). Katzen können auch mit den CPV-Varianten 2a, 2b und 2c infiziert werden (MOCHIZUKI et al., 1993; MOCHIZUKI et al., 1996; TRUYEN et al., 1996b; IKEDA et al., 2000; BATTILANI et al., 2006; DECARO et al., 2010; BATTILANI et al., 2011; DECARO et al., 2011; CLEGG et al., 2012). Aufgrund von Kreuzreaktionen im HAH können die gegen CPV-Varianten gebildeten Antikörper nicht von Antikörpern gegen FPV unterschieden werden (NAKAMURA et al., 2001a). Da CPV-Varianten in Costa Rica häufig sind (BLANCO et al., 2009), könnte die hohe Prävalenz von Antikörpern zumindest teilweise auf eine natürliche Exposition mit CPV-Varianten zurückzuführen sein.

Letztendlich könnten auch verschiedene Methoden zur Untersuchung auf Antikörper (ELISA *versus* HAH) mit unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten zu den unterschiedlichen Prävalenzen beitragen. Der HAH ist allerdings generell als Goldstandard zur Messung von Antikörpern gegen FPV akzeptiert und wurde bislang auch in den meisten Prävalenzstudien verwendet (LAPPIN et al., 2002; BLANCO et al., 2009; DIGANGI et al., 2012a).

Von verschiedenen Autoren werden verschiedene Antikörpertiter von 1:20 und 1:40 im HAH als Cut-off als ein positives Ergebnis angesehen und als schützend vor einer Infektion interpretiert (LAPPIN et al., 2002; MOUZIN et al., 2004; DIGANGI et al., 2011). In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurde ein Cut-off von 1:40 im HAH zur Differenzierung von Antikörper-positiven und Antikörper-negativen Katzen gewählt. Antikörpertiter $\geq 1:40$ sind sowohl nach natürlicher Infektion, als auch nach einer aktiven oder passiven Immunisierung mit dem Schutz vor einer Infektion assoziiert (SCOTT et al., 1970c; SCOTT & GEISSINGER, 1999; MOUZIN et al., 2004; PATTERSON et al., 2007; REESE et al., 2008; DIGANGI et al., 2011), weswegen dieser Cut-off sowohl bei ausgewachsenen Katzen als auch bei Katzenwelpen, die noch über MDA verfügen, verwendet werden kann. Seit kurzem wird postuliert, dass jeglicher Nachweis von aktiv gebildeten Antikörpern, also auch ein Antikörpertiter unter 1:40, mit dem Schutz vor feliner Panleukopenie assoziiert ist (LAPPIN, 2012; DAY, 2013). Dies konnte bereits vor mehreren Jahren in Infektionsexperimenten an SPF-Welpen gezeigt werden (LAPPIN et al., 2002). Es wird davon ausgegangen, dass bei ausgewachsenen Katzen, die Antikörper nach einer natürlichen Exposition oder Impfung entwickelt haben, das Vorhandensein von Antikörpern in jeglicher Höhe einen Schutz vor feliner Panleukopenie vorhersagt, da bei diesen Katzen das Immunsystem auf den Antigenkontakt mit der aktiven Bildung von Antikörpern reagiert hat (LAPPIN et al., 2002).

Wie zu erwarten konnten bei geimpften Katzen häufiger Antikörper nachgewiesen werden. Bezüglich der Prävalenz von Antikörpern gab es aber auch mehrere unerwartete Untersuchungsergebnisse. Als erstes unerwartetes Ergebnis ist zu nennen, dass bei acht von 28 Katzen (28,6 %), die nachweislich nie zuvor geimpft worden waren, Antikörper nachgewiesen wurden. Fünf dieser Katzen hatten Freigang, so dass die Antikörper durch eine natürliche Exposition mit FPV oder CPV-Varianten in der Vergangenheit erklärt werden können. Dagegen hatten die

verbleibenden drei Katzen nachweislich keinen Freigang. Bei zwei dieser Katzen könnten der Nachweis von MDA und eine intrauterine FPV-Infektion für das Ergebnis verantwortlich sein. Damit bleibt bei einer Wohnungskatze die Ursache für das Vorhandensein von Antikörpern unklar. Aber ein Kontakt zu mit CPV-Varianten infizierten Hunden oder ein Aufenthalt in einer mit CPV-Varianten kontaminierten Umwelt sind auch hier mögliche Erklärungen. KRUSE und Mitarbeiter (2010) berichteten in einer Studie von Wohnungskatzen, die an feliner Panleukopenie erkrankt waren, von denen 14,5 % niemals Kontakt zu anderen Katzen hatten. Damit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie erneut die Gefährdung auch von Katzen, die ausschließlich in der Wohnung gehalten werden. Als weiteres erstaunliches Ergebnis ist zu nennen, dass elf von 47 (23,4 %) Katzen, die nachweislich entsprechend der aktuellen Leitlinien geimpft worden waren (RICHARDS et al., 2006; TRUYEN et al., 2009; DAY et al., 2010; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VET., 2013), keine Antikörper gegen FPV hatten. Hier ist ein Versagen der Impfung aufgrund ihrer Wechselwirkung mit MDA, die länger als 16 Wochen persistierten, sehr wahrscheinlich. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass MDA noch bis zur 20. Lebenswoche nachgewiesen werden können, und dass sogar Antikörper in sehr niedriger Titerhöhe noch in der Lage sind, die aktive Bildung von Antikörpern zu verhindern (JAKEL et al., 2012). In der Studie von JAKEL und Mitarbeitern (2012) interferierten MDA mit den Welpenimpfungen im Alter von acht, zwölf und 16 Wochen, so dass selbst nach drei Impfungen im Abstand von drei bis vier Wochen 37 % der Welpen anschließend keine Antikörper gebildet hatten. Ein weiteres erstaunliches Ergebnis ist, dass acht von 18 (44,4 %) Katzen, deren letzte Impfung zwischen drei und sieben Jahren zurück lag, keine Antikörper hatten. Das Ergebnis überrascht, da man derzeit annimmt, dass die Dauer der Immunität gegenüber FPV mindestens sieben Jahre beträgt, wie dies in Infektionsexperimenten an SPF-Katzen gezeigt werden konnte (SCOTT & GEISSINGER, 1999). Mögliche Erklärungen sind hier, dass ein Teil der Katzen in dieser Studie nie Antikörper entwickelt hatte oder dass die Immunität gegen FPV bei Katzen im Feld doch kürzer ist, als bislang angenommen, und die Dauer der Immunität folglich nicht von experimentellen Studien abgeleitet werden kann. Es ist unsicher, ob die Katzen der vorliegenden Studie, bei denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten, dennoch aufgrund anderer Mechanismen geschützt gewesen sein könnten. Es konnte bei geimpften SPF-

Welpen gezeigt werden, dass diese gegen eine experimentelle Infektion geschützt waren, auch wenn keine Antikörper nachweisbar waren. Dieser Schutz ist dann wahrscheinlich auf eine zelluläre Immunität oder sich schnell bildende Antikörper in Folge bereits bestehender Gedächtniszellen zurückzuführen (TIZARD & NI, 1998; LAPPIN et al., 2002). Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass einige Katzen dieser Studie niedrige Antikörpertiter hatten, die unterhalb der Nachweisgrenze von 1:40 im HAH lagen.

In der vorliegenden Studie konnte eine Assoziation zwischen dem Fehlen von Antikörpern und dem Bestehen einer CKD nachgewiesen werden. In der Humanmedizin wurde bereits beschrieben, dass chronisches Nierenversagen (CRF) mit einer verminderten Bildung von Antikörpern nach einer Impfung einhergehen kann. Beim Menschen nimmt die Bildung von Antikörpern nach einer Impfung gegen Hepatitis B bei fortschreitendem CRF ab (AGARWAL et al., 1999), so dass sich die Wahrscheinlichkeit einer adäquaten Immunantwort anhand der Nierenfunktion, gemessen als glomeruläre Filtrationsrate (GFR), vorhersagen lässt (AGARWAL et al., 1999; DAROZA et al., 2003). Für diese verminderte Antikörperantwort werden in der Humanmedizin verschiedene Gründe diskutiert. Mangelernährung (LOMBARDI et al., 1992) oder eine inadäquate Funktion der Immunzellen infolge chronischer Urämie (PESANTI, 2001) könnten die Immunantwort direkt oder indirekt beeinträchtigen. Dadurch könnte es zu einer generalisierten Immunsuppression mit verminderter Antikörperbildung kommen. In der Veterinärmedizin gibt es bislang keine entsprechenden Studien, die diese Zusammenhänge untersuchen.

Ein weiterer Faktor, der in dieser Studie mit dem Fehlen von Antikörpern assoziiert war, war das gleichzeitige Bestehen einer Neoplasie. Bislang gibt es in der Veterinärmedizin keine Studien zur Immunantwort nach Impfungen bei Tumorpatienten. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse aus der Humanmedizin weist darauf hin, dass Tumorpatienten nach einer Impfung gegen Influenzaviren seltener Antikörper bilden (BECK et al., 2012). Bei Tumorpatienten verursacht ein komplexes Netzwerk verschiedener tumorassoziierter Faktoren mit immunsupprimierender Funktion eine generalisierte Immunsuppression (KIM et al., 2006) und führt darüber vermutlich zu einer eingeschränkten Immunantwort nach einer Impfung.

Katzen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung mit Glukokortikoiden behandelt wurden, hatten in der vorliegenden Studie ebenfalls ein erhöhtes Risiko, keine Antikörper gegen FPV zu haben. Eine experimentelle Studie bei Beagle-Welpen untersuchte den Effekt von oral verabreichtem Prednisolon auf eine Impfung gegen CDV. Bei diesen Hunden hatten jedoch weder Dosierungen von 1 mg/kg, noch von 10 mg/kg Prednisolon über einen Zeitraum von jeweils 21 Tagen einen Effekt auf die Immunantwort nach einer Impfung (NARA et al., 1979). In der vorliegenden Studie hatten jedoch 52,4 % (11/21) der mit Glukokortikoiden behandelten Katzen keine Antikörper gegen FPV. Es konnte auch gezeigt werden, dass Katzen, die über einen Zeitraum von über elf Wochen mit Glukokortikoiden behandelt wurden, ein höheres Risiko hatten, keine Antikörper gegen FPV zu haben, als Katzen, die kürzer behandelt wurden.

Mehrere Faktoren waren nicht mit dem Fehlen von Antikörpern assoziiert. Die anfängliche Vermutung, dass die Rasse ein Risikofaktor sein könnte, basierte darauf, dass es in Deutschland ab 2008 gehäuft zu Ausbrüchen feline Panleukopenie in Zuchten mit geimpften Norwegischen Waldkatzen kam. In den entsprechenden Meldungen an das PEI wurde der Verdacht einer mangelhaften Wirksamkeit der Impfung gegen FPV geäußert (HOFFMANN et al., 2010). Eine daraufhin veranlasste Studie konnte jedoch keine Unterschiede bezüglich der Antikörperprävalenz und -bildung zwischen Norwegischen Waldkatzen und Europäisch-Kurzhaar-Katzen feststellen (JAKEL et al., 2012). Auch in der vorliegenden Studie konnten bezüglich der Prävalenz von Antikörpern gegen FPV keine Rasseunterschiede festgestellt werden. Auch das Geschlecht und der Kastrationsstatus der Katzen waren keine Risikofaktoren. Die fehlende Assoziation zwischen dem Alter der Katzen und dem Fehlen von Antikörpern gegen FPV war dagegen ein überraschendes Ergebnis. Es wäre zu erwarten gewesen, dass bei Katzen mit zunehmendem Alter infolge häufiger Impfungen und der steigenden Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Exposition auch häufiger Antikörper gegen FPV nachweisbar sind, insbesondere da eine höhere Antikörperprävalenz bei älteren Katzen bereits in anderen Studien festgestellt wurde (SCOTT & GEISSINGER, 1999; HELLARD et al., 2011; DIGANGI et al., 2012a). Möglicherweise war der kumulative Effekt der Antikörper in der vorliegenden Studie geringer als in den vorangegangenen Studien. Dies wiederum könnte auf eine kürzere Dauer der Immunität, als sie bislang angenommen wurde,

zurückzuführen sein. Auch wäre es möglich, dass die Katzen der vorliegenden Studie, die zu einem großen Teil chronisch krank waren (29,5 %), im Laufe ihres Lebens seltener Antikörper gebildet hatten.

Die erste Studie dieser Arbeit zeigte, dass ein relativ großer Anteil der Katzen (29,4 %) keine Antikörper gegen FPV hat. Die routinemäßige Messung von Antikörpern ist in der präventiven Veterinärmedizin jedoch neu und für FPV in Deutschland noch nicht etabliert. Mit Hilfe der Messung von Antikörpern im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks könnten ungeschützte Katzen erkannt werden. Dadurch könnte ein zu häufiges Impfen bereits geschützter Katzen verhindert werden. Da der HAH nur im Labor durchgeführt werden kann, wäre als Alternative ein zuverlässiger Schnelltest für den Einsatz in der Praxis wünschenswert.

Seit dem Jahr 2010 steht in Europa ein Schnelltest, der ImmunoComb® Feline VacciCheck, zur Antikörper-Messung zur Verfügung. Dieser Schnelltest misst Antikörper gegen FPV, FHV-1 und FCV. Er wurde erstmals in einer Population von größtenteils jungen und gesunden Katzen mit unbekanntem Impfstatus in einem Tierheim in Florida evaluiert (DIGANGI et al., 2011). In der Zwischenzeit wurde er durch den Hersteller modifiziert, mit dem Ziel, die Sensitivität zu verbessern. Seitdem wurde der Test noch nicht in einer unabhängigen Studie evaluiert. Er wurde bisher auch nicht in einer Population von Katzen unterschiedlicher Herkunft, Lebens- und Haltungsbedingungen, Gesundheitszustände und mit unterschiedlichem Impfstatus evaluiert, so dass zurzeit nicht bekannt ist, inwieweit er zuverlässig in der tierärztlichen Praxis eingesetzt werden kann.

Das Ziel der zweiten Studie der vorliegenden Arbeit war daher die Evaluation des Schnelltests ImmunoComb® Feline VacciCheck zur Bestimmung von Antikörpern gegen FPV im Vergleich zum Goldstandard HAH. Für den Einsatz in der tiermedizinischen Praxis im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks dient der Test insbesondere der Erkennung ungeschützter Katzen, um diese dann gezielt zu impfen.

Die Evaluation des Schnelltests erfolgte anhand der Serumproben der ersten Studie. Die Studienpopulation entsprach somit bezüglich Signalement, Herkunft, Lebens- und Haltungsbedingungen, Gesundheitszustand und Impfstatus im

Wesentlichen dem typischen Patientenkollektiv in einer tierärztlichen Praxis. Diese Vergleichbarkeit ist Voraussetzung für die zuverlässige Beurteilung des Tests (POLZIN et al., 1999). Insgesamt wurden 347 Serumproben untersucht, die Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV für drei verschiedene Cut-offs als ein positives Ergebnis ($\geq 1:20$, $\geq 1:40$, $\geq 1:80$) im HAH bestimmt und zudem die Praktikabilität des Tests evaluiert.

Der ImmunoComb[®] Feline VacciCheck wurde für den Nachweis von IgG-Antikörpern in Serum, Plasma oder Vollblut bei Katzen konzipiert und dient, wie die Antikörpermessung im Labor, der Bestimmung des individuellen Immunstatus von Katzen. Der Hersteller gibt für den Test eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 98 % an (BIOGAL GALED LABORATORIES, 2012).

Als Goldstandard für den Nachweis von Antikörpern gegen FPV diene der HAH (JOHNSON, 1971; LAPPIN et al., 2002; DIGANGI et al., 2011; JAKEL et al., 2012; LAPPIN, 2012). Dieser hat im Vergleich mit anderen Methoden zur Antikörperbestimmung mehrere Vorteile. Der HAH misst sowohl Antikörper gegen FPV als auch CPV-Varianten (NAKAMURA et al., 2001a). Die Technik ist einfach und gut etabliert und die benötigte Ausstattung und Reagenzien sind kostengünstig (JOHNSON, 1971; GILLESPIE & SCOTT, 1973; LUFF et al., 1987). Allerdings eignet sich dieser Test nicht für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis. Ein weiterer Nachteil der Methode ist die mögliche subjektive Interpretation der Mikrotiterplatten. Um dieses Risiko zu minimieren, wurden die Platten in dieser Studie von zwei voneinander unabhängigen Personen abgelesen. Traten zwei voneinander abweichende Ergebnisse auf, so wurden diese von einer dritten Person überprüft, die keine Kenntnis von den anderen Ergebnissen hatte. Alle beteiligten Personen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung gegenüber den Ergebnissen des HAH und gegenüber den Daten der Studienteilnehmer verblindet. Da in drei Fällen die Probenmenge für den Schnelltest nicht ausreichte, wurden nur 347 der 350 Serumproben analysiert.

Bezüglich seiner Praktikabilität hatte der Test im Vergleich zur Antikörpermessung mittels HAH im Labor mehrere Vorteile. Der Test kann in 21 Minuten durchgeführt werden, was zur Folge hat, dass die Testergebnisse noch während des Aufenthaltes des Patienten in der tierärztlichen Praxis verfügbar wären. Ein weiterer Vorteil ist die nur sehr geringe erforderliche Probenmenge. Für die Durchführung des Schnelltests genügten 5 Mikroliter (μl) Serum,

wohingegen für den HAH im Labor etwa 100 µl Serum benötigt werden. Alternativ könnten für den Schnelltest 5 µl Plasma oder 10 µl Vollblut verwendet werden.

Zur Beurteilung der Qualität des Tests wurde die Spezifität als der wichtigste Kennwert erachtet. Für die Verwendung des Tests im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks ist gerade die Erkennung ungeschützter Katzen von Bedeutung und damit eine niedrige Anzahl falsch-positiver Ergebnisse wesentlich. Vor Studienbeginn wurde festgelegt, dass eine Spezifität von $\geq 90\%$ als gut angesehen werden kann. Eine Spezifität von 80 % bis 90 % wurde als akzeptabel und eine Spezifität unter 80 % wurde als inakzeptabel für eine Empfehlung angesehen.

Der Hersteller des Tests gibt an, dass ein positives Ergebnis einem Antikörpertiter von $\geq 1:80$ im HAH entspricht. Würde man, entsprechend dieser Herstellerangaben, zur Beurteilung des Tests einen Cut-off von $\geq 1:80$ im HAH zugrunde legen, so wäre die Spezifität des Tests nur 81 % und eine verhältnismäßig hohe Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen (23/347) vorhanden. Die Qualität des Tests wäre entsprechend den vorab festgelegten Grenzwerten für die Spezifität nicht als gut anzusehen, und die Spezifität wäre deutlich geringer als in der Tierheimstudie aus Florida (99 %) (DIGANGI et al., 2011) und als vom Hersteller (98 %) für diesen Test beschrieben. Dahingegen wäre die Sensitivität des Tests (87 %) deutlich höher als in der Tierheimstudie aus Florida (49 %) (DIGANGI et al., 2011), wenn auch nicht so hoch wie vom Hersteller angegeben (90 %). Auf der Basis eines Cut-offs von $\geq 1:80$ gäbe es 30 falsch-negativ getestete Serumproben. Katzen mit einem falsch-negativen Testergebnis würden folglich eine Impfung erhalten obwohl sie zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung bereits vor einer Infektion geschützt sind. Idealerweise sollten nur ungeschützte Katzen geimpft werden, um die Risiken eventueller Nebenwirkungen einer Impfung zu reduzieren. Wenn auch sehr selten, kann es nach einer Impfung zu milden bis schweren Nebenwirkungen kommen, zu denen auch die Bildung eines FISS gehört (SRIVASTAV et al., 2012). FISS bilden nach der chirurgischen Entfernung nicht selten Rezidive und haben insgesamt eine vorsichtig Prognose (MCENTEE & PAGE, 2001; MOORE & HOGENESCH, 2010). FISS werden zwar häufiger nach der Verwendung von Adjuvantien-enthaltenden, inaktivierten Impfstoffen beobachtet werden (z. B. viele Impfstoffe

gegen Tollwut), können aber auch nach FPV-/FHV-1-/FCV-Impfungen auftreten (DE MAN & DUCATELLE, 2007).

Die Unterschiede zwischen der Tierheimstudie aus Florida und der vorliegenden Studie, aber auch die Unterschiede zu den Herstellerangaben bezüglich der Sensitivität und Spezifität des Tests könnten auf Modifikationen durch den Hersteller zurückzuführen sein, so dass eine Verbesserung der Sensitivität zu einer Verschlechterung der Spezifität führte. Da im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks eine hohe Spezifität des Tests zur Erkennung von ungeschützten Katzen jedoch deutlich wichtiger ist als eine hohe Sensitivität, ist diese Entwicklung als negativ anzusehen.

In vorangegangenen Studien, wie z. B. in der Tierheimstudie aus Florida, wurden bereits etwas niedrigere Antikörpertiter ($\geq 1:40$) als schützend vor einer Infektion angesehen (MOUZIN et al., 2004; PATTERSON et al., 2007; REESE et al., 2008; DIGANGI et al., 2011). Würde man in dieser Studie einen Cut-off von $\geq 1:40$ für ein positives Ergebnis zugrunde legen, so wäre die Spezifität des ImmunoComb® Feline VacciCheck mit 86 % zwar etwas höher, aber ebenfalls nicht als gut anzusehen.

Derzeit wird bei erwachsenen Katzen, die geimpft sind oder bereits eine Infektion überstanden haben, der Nachweis von Antikörpern in jeglicher Höhe mit dem Schutz vor einer Infektion gleichgesetzt (LAPPIN, 2012; DAY, 2013). Basierend auf einem niedrigen Cut-off von $\geq 1:20$ für ein positives Ergebnis zeigte der ImmunoComb® Feline VacciCheck in dieser Studie eine Spezifität von 89 % und erreichte damit fast den für ein gutes Ergebnis vorher festgelegten Grenzwert von ≥ 90 %. Der Test zeigte bei Wahl dieses Cut-offs eine verhältnismäßig niedrige Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen (neun).

Zu den Limitationen der ersten Studie gehörte, dass die Zuverlässigkeit der Patientendaten, wie z. B. das Geburtsdatum, von den Angaben der Besitzer abhängig war. Außerdem wurden nur Katzen eingeschlossen werden, die in der Medizinischen Kleintierklinik und der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt wurden. Dadurch fand eine gewisse Selektion der Katzen statt, so dass die Studienpopulation nicht für die gesamte Katzenpopulation repräsentativ war. Eine Limitation, die beide Studien betrifft, war, dass ausschließlich der Nachweis von

Antikörpern für die Bestimmung des Immunstatus der Katzen verwendet und mit dem Schutz vor einer Infektion mit FPV gleichgesetzt wurde. Grundsätzlich ist es auch möglich, dass Katzen, bei denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten, trotzdem vor einer Infektion geschützt waren. Diese Katzen könnten aufgrund zellulärer Immunität oder sich schnell bildender Antikörper infolge bereits bestehender Gedächtniszellen geschützt gewesen sein (TIZARD & NI, 1998; LAPPIN et al., 2002). Der tatsächliche Schutz der Studienpopulation blieb also unsicher. Er hätte letztendlich nur mittels experimenteller Infektion der Katzen bestimmt werden können. Dies war in der vorliegenden Arbeit mit Katzen aus Privatbesitz nicht möglich.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der ersten Studie, dass etwa ein Drittel der Katzen keine Antikörper gegen FPV hatte und damit wahrscheinlich nicht vor einer Infektion mit FPV geschützt war. Dabei hatten Katzen mit CKD, Neoplasie oder unter Glukokortikoidtherapie ein signifikant höheres Risiko, keine Antikörper gegen FPV zu haben. Geimpfte Katzen hatten signifikant häufiger Antikörper. Dennoch hatte eine gewisse Anzahl an Katzen, die entsprechend der aktuellen Leitlinien geimpft waren, keine Antikörper. Im Gegensatz dazu hatten einige ungeimpfte Katzen Antikörper, sehr wahrscheinlich infolge einer natürlichen Exposition mit FPV oder CPV-Varianten. Entsprechend der Untersuchungsergebnisse der ersten Studie wird für alle Katzen, insbesondere jedoch für Katzen mit CKD, Neoplasie oder unter Glukokortikoidtherapie, die Messung von Antikörpern zur Bestimmung des individuellen Immunstatus im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks empfohlen. Hierfür wäre der im zweiten Teil dieser Arbeit evaluierte Schnelltest ImmunoComb® Feline VacciCheck geeignet. Basierend auf einem Antikörpertiter von $\geq 1:20$ als Cut-off für ein positives Ergebnis, war der Test hinsichtlich seiner Spezifität und Praktikabilität akzeptabel. Er erreichte fast die angestrebte Spezifität von 90 %. Er kann damit zur Bestimmung des individuellen Immunstatus erwachsener Katzen im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks empfohlen werden. Dennoch wäre eine weitere Modifikation des Tests mit dem Ziel, die Spezifität noch zu verbessern, wünschenswert, um möglichst viele ungeschützte Katzen erkennen und impfen zu können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Entsprechend nationaler und internationaler Leitlinien sollte jede Katze zu jeder Zeit vor einer Infektion mit dem feline Panleukopenievirus geschützt sein, entweder infolge einer natürlichen Infektion oder einer erfolgreichen Impfung. Derzeit empfehlen die Expertengruppen Katzenwelpen alle drei bis vier Wochen bis zu einem Alter von 16 Wochen, anschließend nach einem Jahr und darüber hinaus alle drei Jahre gegen das feline Panleukopenievirus zu impfen. Dennoch kommt es regelmäßig zu Ausbrüchen von feline Panleukopenie, so dass der derzeitige Schutz der Population in Deutschland fraglich erscheint.

Die Messung von Antikörpern gegen das feline Panleukopenievirus kann zur Bestimmung des individuellen Immunstatus genutzt werden. Neben dem Hämagglutinationshemmtest als Goldstandard, der sich jedoch nicht für den Einsatz in der Praxis eignet, ist inzwischen ein Schnelltest, der ImmunoComb® Feline VacciCheck, in Europa erhältlich.

Ziel der ersten Studie war daher die Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen das feline Panleukopenievirus bei privat gehaltenen Katzen in Süddeutschland. Im Rahmen dieser Studie sollte zudem untersucht werden, ob es Risikofaktoren für das Fehlen von Antikörpern gibt. Dreihundertfünfzig Katzen wurden in die Studie eingeschlossen, Krankenakten wurden ausgewertet und Serumproben mittels Hämagglutinationshemmtest auf Antikörper gegen das feline Panleukopenievirus untersucht. Ein Antikörpertiter von $\geq 1:40$ galt in dieser Studie als positives Ergebnis (Cut-off).

Das Ziel der zweiten Studie war die Evaluation des Schnelltests ImmunoComb® Feline VacciCheck zur Bestimmung von Antikörpern gegen das feline Panleukopenievirus im Vergleich zum Goldstandard Hämagglutinationshemmtest. Dieser Schnelltest soll im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks in der tierärztlichen Praxis insbesondere der Erkennung ungeschützter Katzen dienen und damit eine zielgerichtete Impfung ermöglichen. Dazu wurden anhand von 347 Serumproben Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert für drei verschiedene Cut-offs als positives Ergebnis im Hämagglutinationshemmtest ($\geq 1:20$, $\geq 1:40$, $\geq 1:80$) bestimmt. Eine hohe Spezifität und eine damit einhergehende niedrige Anzahl falsch-positiver

Ergebnisse wurden als besonders wichtig erachtet. Zudem wurde die Praktikabilität des Schnelltests beurteilt.

Die in der ersten Studie ermittelte Prävalenz von Antikörpern gegen das feline Panleukopenievirus betrug in der untersuchten Population 70,6 % (247/350). Damit war etwa ein Drittel der Katzen (29,4 %; 103/350) wahrscheinlich nicht vor einer Infektion geschützt. Geimpfte Katzen hatten häufiger Antikörper. Dennoch hatten auch acht von 28 Katzen (28,6 %), die nachweislich nie zuvor geimpft worden waren, Antikörper gegen das feline Panleukopenievirus. Elf von 47 Katzen (23,4 %), die nachweislich entsprechend der aktuellen Leitlinien geimpft worden waren, hatten dagegen keine Antikörper gegen das feline Panleukopenievirus. Chronische Nierenerkrankungen, Neoplasien und Therapie mit Glukokortikoiden konnten als Risikofaktoren, keine Antikörper gegen das feline Panleukopenievirus zu haben, identifiziert werden. Insbesondere Katzen, die über einen Zeitraum von mindestens elf Wochen mit Glukokortikoiden behandelt wurden, hatten ein erhöhtes Risiko, keine Antikörper zu haben.

Der in der zweiten Studie dieser Arbeit evaluierte Schnelltest ImmunoComb® Feline VacciCheck zeigte basierend auf den drei Cut-offs im Hämagglutinationshemmtest ($\geq 1:20$, $\geq 1:40$, $\geq 1:80$) eine Spezifität von 88,8 %, 86,3 % und 81,1 %. Bezüglich seiner Praktikabilität hatte der Schnelltest im Vergleich zur Antikörpermessung mittels Hämagglutinationshemmtest im Labor mehrere Vorteile. Die Testergebnisse waren innerhalb von 21 Minuten verfügbar und der Test erforderte nur eine sehr geringe Probenmenge (5 μ l Serum, 5 μ l Plasma oder 10 μ l Vollblut).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass die Messung von Antikörpern zur Bestimmung des individuellen Immunstatus im Rahmen von regelmäßigen Gesundheitschecks für alle Katzen, insbesondere jedoch für Katzen mit erhöhtem Risiko keine Antikörper gegen das feline Panleukopenievirus zu haben, empfohlen werden sollte. Unter der Voraussetzung, dass bereits niedrige Antikörpertiter von $\geq 1:20$ als schützend vor einer Infektion angesehen werden können (z. B. bei ausgewachsenen Katzen), kann hierfür der Schnelltest ImmunoComb® Feline VacciCheck genutzt werden. Dennoch wäre eine Verbesserung der Spezifität dieses Tests wünschenswert, um das Risiko, ungeschützte Katzen nicht zu erkennen, weiter zu senken.

VII. SUMMARY

According to national and international guidelines, every cat should be protected against infection with feline panleukopenia virus at any time, either due to natural infection or vaccination. Currently, experts recommend vaccinating kittens every three to four weeks until 16 weeks of age, followed by a vaccination after one year and further vaccinations on a triennial basis. However, despite frequent vaccination feline panleukopenia is still commonly diagnosed. Thus, protection of the population in Germany seems doubtful.

Measuring antibody titers against feline panleukopenia virus can be used to evaluate the specific immune status. Hemagglutination inhibition is considered the gold standard, but cannot be performed in everyday practice. Since recently, an in-house test, the ImmunoComb® Feline VacciCheck, is available in Europe.

The aims of the first study were to determine the prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in client-owned cats in Southern Germany and to identify risk factors that might be associated with lack of antibodies. Three hundred and fifty cats were included; medical records were evaluated and serum samples were analyzed by hemagglutination inhibition. An antibody titer cut-off point of $\geq 1:40$ was considered a positive result.

The aim of the second study was to evaluate the in-house test ImmunoComb® Feline VacciCheck to detect antibodies against feline panleukopenia virus comparing it to the gold standard hemagglutination inhibition. The test is considered to be used as part of a regular health assessment in veterinary practice. Its major goal is to identify unprotected cats that require vaccination. Sera of 347 cats were analyzed by ImmunoComb® Feline VacciCheck and hemagglutination inhibition. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated for three different antibody titer cut-off points in hemagglutination inhibition ($\geq 1:20$, $\geq 1:40$, $\geq 1:80$). A high specificity accompanied by a low number of false-positive results, was considered most important for test evaluation. Furthermore, the practicability of the test was assessed.

In the first study, prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in the study population was 70.6% (247/350). Thus, nearly one third of the cats

(29.4%; 103/350) had no antibodies and was likely to have inadequate immunity against infection. Vaccinated cats were more likely to have antibodies. However, eight of 28 cats (28.6%) that had never been vaccinated, also had antibodies against feline panleukopenia virus, while eleven of 47 cats (23.4%) that had been vaccinated according to current guidelines had no antibodies. Chronic kidney disease, neoplasia, and glucocorticoid therapy were associated with lack of antibodies against feline panleukopenia virus. In particular, cats receiving glucocorticoid therapy for at least eleven weeks had an increased risk to have no antibodies.

In the second study, based on the results of three different antibody titer cut-off points in hemagglutination inhibition ($\geq 1:20$, $\geq 1:40$, $\geq 1:80$) the ImmunoComb[®] Feline VacciCheck showed a specificity of 88.8%, 86.3%, and 81.1%, respectively. When comparing practicability, the test showed several benefits in comparison to hemagglutination inhibition. The test could be performed in about 21 minutes and required only a small amount of blood. Serum, plasma or whole blood could be used for analysis.

In conclusion, measuring antibody titers to evaluate the specific immune status of cats as part of a regular health assessment should be recommended for every cat, especially for cats at risk to have no antibodies against feline panleukopenia virus. When considering an antibody titer of $\geq 1:20$ adequate for protection (for example, in an adult animal), the ImmunoComb[®] Feline VacciCheck can be recommended for measuring antibody titers in veterinary practice. However, a further increase of specificity would be desirable, to reduce the risk to miss and not vaccinate unprotected cats.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Addie DD, Toth S, Thompson H, Greenwood N, Jarrett JO. Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens. *Vet Rec* 1998; 142: 353-6.

Agarwal SK, Irshad M, Dash SC. Comparison of two schedules of hepatitis B vaccination in patients with mild, moderate and severe renal failure. *J Assoc Physicians India* 1999; 47: 183-5.

American Veterinary Medical Association. Report of the Panel of the Colloquium on Selected Feline Infectious Diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157: 2043-51.

Appel MJ, Scott FW, Carmichael LE. Isolation and immunisation studies of a canine parvovirus-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec* 1979; 105: 156-9.

Barker IK, Povey RC, Voigt DR. Response of mink, skunk, red fox and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence of antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario. *Can J Comp Med* 1983; 47: 188-97.

Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prosperi S. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology* 2006; 352: 22-6.

Battilani M, Gallina L, Vaccari F, Morganti L. Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1: 209-12.

Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S. Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Vet Res* 2011; 42: 43.

Beck CR, McKenzie BC, Hashim AB, Harris RC, Nguyen-Van-Tam JS. Influenza vaccination for immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis by aetiology. *J Infect Dis* 2012; 1-10.

Bentick-Smith J. Feline panleukopenia, a review of 574 cases. *North Am Vet* 1949; 30: 379-84.

Biogal Galed Laboratories. ImmunoComb Feline VacciCheck panleukopenia, herpes virus and calici virus IgG antibody test kit. Product information. Kibbutz Galed, Israel, 2012

Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220.

Bittle JL, Emrich SA, Gauker FB. Safety and efficacy of an inactivated tissue culture vaccine for feline panleukopenia. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157: 2052-6.

Black JW, Holscher MA, Powell HS, Byerly CS. Parvoviral enteritis and panleukopenia in dogs. *Vet Med Small Anim Clin* 1979; 74: 47-50.

Blanco K, Prendas J, Cortes R, Jimenez C, Dolz G. Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 661-3.

Boehm M, Thompson H, Weir A, Hasted AM, Maxwell NS, Herrtage ME. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *Vet Rec* 2004; 154: 457-63.

Brun A, Chappuis G, Precausta P, Terre J. Immunisation against panleukopenia: early development of immunity. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1979; 1: 335-9.

Bundesverband Praktizierender Tierärzte e. V. Impfung. Impfen schützt Katzen vor tödlichen Infektionskrankheiten. Frankfurt am Main 2007: 1-15.

Buonavoglia C, Tollis M, Buonavoglia D, Puccini A. Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 281-3.

Buonavoglia C, Marsilio F, Tempesta M, Buonavoglia D, Tiscar PG, Cavalli A, Compagnucci M. Use of a feline panleukopenia modified live virus vaccine in cats in the primary-stage of feline immunodeficiency virus infection. *Zentralbl Veterinarmed B* 1993; 40: 343-6.

Buonavoglia C, Cavalli A, Gravino E, Voigt V, Buonavoglia D, de Caprariis D. Intranasal vaccination of pups with maternally derived antibodies with a modified live canine parvovirus. *Zentralbl Veterinarmed B* 1994; 41: 3-8.

Buonavoglia C, Cavalli A, Tempesta M, Voight V, Buonavoglia D, Corrente M, Sagazio P. Intranasal vaccination of pups in the presence of maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV). Evaluation of minimal immunizing dose. *New Microbiol* 1995; 18: 371-5.

Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol* 2001; 82: 3021-5.

Burtonboy S, Charlier P, Hertoghs J, Lobmann M, Wiseman A, Woods S. Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Vet Rec* 1991; 128: 377-81.

Calderon MG, Mattion N, Bucafusco D, Fogel F, Remorini P, La Torre J. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J Virol Methods* 2009; 159: 141-5.

Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res* 1980; 41: 784-91.

Carmichael LE, Binn LN. New enteric viruses in the dog. *Adv Vet Sci Comp Med* 1981; 25: 1-37.

Carmichael LE. An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52: 303-11.

Casseleux G, Fontaine E. Gestion de la parvovirose en élevage canin. *Point Vet* 2006; 37: 42-6.

Cave TA, Thompson H, Reid SW, Hodgson DR, Addie DD. Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000). *Vet Rec* 2002; 151: 497-501.

Cello RM. Comments on feline panleukopenia. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: 861.

Chalmers WS, Truyen U, Greenwood NM, Baxendale W. Efficacy of feline panleucopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat. *Vet Microbiol* 1999; 69: 41-5.

Chang SF, Sgro JY, Parrish CR. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol* 1992; 66: 6858-67.

Chapek ML, McClaughry LE, Wilkins LM. Efficiency and safety of an inactivated feline parvovirus vaccine against canine parvovirus infection. *Mod Vet Pract* 1980; 61: 261-3.

Chappuis G, Duret C. Safety and antigenicity of live, modified feline panleukopenia virus, used as a vaccine in dogs (against parvovirus infection). *Point Vet* 1980; 10: 77-9.

Claus MA, Levy JK, MacDonald K, Tucker SJ, Crawford PC. Immunoglobulin concentrations in feline colostrum and milk, and the requirement of colostrum for passive transfer of immunity to neonatal kittens. *J Feline Med Surg* 2006; 8: 184-91.

Clegg SR, Coyne KP, Parker J, Dawson S, Godsall SA, Pinchbeck G, Cripps PJ, Gaskell RM, Radford AD. Molecular epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic. *J Virol* 2011; 85: 7892-9.

Clegg SR, Coyne KP, Dawson S, Spibey N, Gaskell RM, Radford AD. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Vet Microbiol* 2012; 157: 78-85.

Cockburn A. Infectious enteritis in the Zoological Gardens, Regent's Park. *Br Vet J* 1947; 103: 261.

Cotmore SF, Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 1987; 33: 91-174.

Csiza CK, Scott FW, de Lahunta A, Gillespie JH. Immune carrier state of feline panleukopenia virus-infected cats. *Am J Vet Res* 1971a; 32: 419-26.

Csiza CK, Scott FW, de Lahunta A, Gillespie JH. Pathogenesis of feline panleukopenia virus in susceptible newborn kittens I. Clinical signs, hematology, serology, and virology. *Infect Immun* 1971b; 3: 833-7.

DaRoza G, Loewen A, Djurdjev O, Love J, Kempston C, Burnett S, Kiaii M, Taylor PA, Levin A. Stage of chronic kidney disease predicts seroconversion after hepatitis B immunization: earlier is better. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 1184-92.

Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM, Wood G, Chalmers WS. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 17-22.

Day MJ. Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol* 2007; 137 Suppl 1: S10-5.

Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *J Small Anim Pract* 2007a; 48: 528-41.

Day MJ, Schoon HA, Magnol JP, Saik J, Devauchelle P, Truyen U, Gruffydd-Jones TJ, Cozette V, Jas D, Poulet H, Pollmeier M, Thibault JC. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 2007b; 25: 4073-84.

Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 1-32.

Day MJ. What we need to know about vaccination and titre testing. British Small Animal Veterinary Association Congress, Birmingham 2012: 1-7.

Day MJ. Utility of serum antibody assays to monitor protection and the need for vaccination. Pre-Congress Symposium, European College of Veterinary Internal Medicine, Liverpool 2013: 23-5.

de Man MM, Ducatelle RV. Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 432-4.

de Ybanez RR, Vela C, Cortes E, Simarro I, Casal JJ. Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet Rec* 1995; 136: 174-5.

Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 2005; 105: 19-28.

Decaro N, Elia G, Desario C, Roperto S, Martella V, Campolo M, Lorusso A, Cavalli A, Buonavoglia C. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J Virol Methods* 2006a; 136: 65-70.

Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, Cirone F, Lorusso E, Lucente MS, Narcisi D, Scalia P, Buonavoglia C. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods* 2006b; 133: 92-9.

Decaro N, Martella V, Desario C, Bellacicco AL, Camero M, Manna L, d'Aloja D, Buonavoglia C. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006c; 53: 468-72.

Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 2007a; 13: 1222-4.

Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martella V, Buonavoglia C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 2007b; 25: 1161-6.

Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol* 2008a; 31: 125-30.

Decaro N, Desario C, Miccolupo A, Campolo M, Parisi A, Martella V, Amorisco F, Lucente MS, Lavazza A, Buonavoglia C. Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J Gen Virol* 2008b; 89: 2290-8.

Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mari V, Colaianni ML, Cavalli A, Di Trani L, Buonavoglia C. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 2009; 385: 5-10.

Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, Amorisco F, Colaianni ML, Parisi A, Terio V, Elia G, Lucente MS, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res Vet Sci* 2010; 89: 275-8.

Decaro N, Desario C, Amorisco F, Losurdo M, Colaianni ML, Greco MF, Buonavoglia C. Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 231-6.

Diehl LJ, Hoover EA. Early and progressive helper T-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5: 1188-94.

DiGangi BA, Gray LK, Levy JK, Dubovi EJ, Tucker SJ. Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 912-8.

DiGangi BA, Levy JK, Griffin B, McGorray SP, Dubovi EJ, Dingman PA, Tucker SJ. Prevalence of serum antibody titers against feline panleukopenia virus, feline

herpesvirus 1, and feline calicivirus in cats entering a Florida animal shelter. J Am Vet Med Assoc 2012a; 241: 1320-5.

DiGangi BA, Levy JK, Griffin B, Reese MJ, Dingman PA, Tucker SJ, Dubovi EJ. Effects of maternally-derived antibodies on serologic responses to vaccination in kittens. J Feline Med Surg 2012b; 14: 118-23.

Elston T, Rodan H, Flemming D, Ford RB, Hustead DR, Richards JR, Rosen DK, Scherk-Nixon MA, Scott PW. 1998 report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines. J Am Vet Med Assoc 1998; 212: 227-41.

Erhardt W. Use of passive and active vaccines against panleukopenia in cats. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1977; 90: 337-40.

European Advisory Board on Cat Diseases. ABCD Guidelines: Feline panleukopenia (2012 Edition). 2012: http://abcd-vets.org/guidelines/guidelines_pdf/1201-FPV_Guideline.pdf.

Fastier LB. Feline panleucopenia - a serological study. Vet Rec 1968; 83: 653-4.

Fischer SM, Quest CM, Dubovi EJ, Davis RD, Tucker SJ, Friary JA, Crawford PC, Ricke TA, Levy JK. Response of feral cats to vaccination at the time of neutering. J Am Vet Med Assoc 2007; 230: 52-8.

Flower RL, Wilcox GE, Robinson WF. Antigenic differences between canine parvovirus and feline panleucopenia virus. Vet Rec 1980; 107: 254-6.

Franchini M. Die Tollwutimpfung von mit felinem Leukämievirus infizierten Katzen. Dissertation. Universität Zürich 1990.

Friedrich K, Truyen U. Untersuchungen der Wirksamkeit von Parvovirusimpfstoffen und der Effektivität zweier Impfschemata. *Prakt Tierarzt* 2000; 12: 988-94.

Fromont E, Artois M, Pontier D. Cat population structure and circulation of feline viruses. *Acta Oecologia* 1996; 17: 609-20.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 2011; 12: 1035-44.

Gamoh K, Shimazaki Y, Makie H, Senda M, Itoh O, Inoue Y. The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 1027-9.

Gamoh K, Senda M, Inoue Y, Itoh O. Efficacy of an inactivated feline panleucopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat. *Vet Rec* 2005; 157: 285-7.

Gaskell RM, Gettinby G, Graham SJ, Skilton D. Veterinary Products Committee working group report on feline and canine vaccination. *Vet Rec* 2002; 150: 126-34.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327: 656-61.

Gillespie JH, Scott FW. Feline viral infections. *Adv Vet Sci Comp Med* 1973; 17: 163-200.

Glickman LT, Domanski LM, Patronek GJ, Visintainer F. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 589-94.

Goldstein S. Virulent virus kills 93 shelter cats. *Chicago Tribune* 2005: 1.

Gore TC, Lakshmanan N, Williams JR, Jirjis FF, Chester ST, Duncan KL, Coyne MJ, Lum MA, Sterner FJ. Three-year duration of immunity in cats following vaccination against feline rhinotracheitis virus, feline calicivirus, and feline panleukopenia virus. *Vet Ther* 2006; 7: 213-22.

Goto H, Yachida S, Shirahata T, Shimizu K. Feline panleukopenia in Japan. I. Isolation and characterization of the virus. *Nihon Juigaku Zasshi* 1974; 36: 203-11.

Goto H. Feline panleukopenia in Japan. II. Hemagglutinability of the isolated virus. *Nihon Juigaku Zasshi* 1975; 37: 239-45.

Govindasamy L, Hueffer K, Parrish CR, Agbandje-McKenna M. Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants. *J Virol* 2003; 77: 12211-21.

Greene CE, Addie DD. Feline parvovirus infections. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. Greene CE, ed. Philadelphia: WB Saunders 2006: 80-8.

Greene CE, Schultz RD. Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. Greene CE, ed. Philadelphia: WB Saunders 2006: 1069-119.

Greenwood NM, Chalmers WS, Baxendale W, Thompson H. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains. *Vet Rec* 1995; 136: 63-7.

Gueguen S, Martin V, Bonnet L, Saunier D, Mahl P, Aubert A. Safety and efficacy of a recombinant FeLV vaccine combined with a live feline rhinotracheitis, calicivirus and panleukopenia vaccine. *Vet Rec* 2000; 146: 380-1.

Hafenstein S, Bowman VD, Sun T, Nelson CD, Palermo LM, Chipman PR, Battisti AJ, Parrish CR, Rossmann MG. Structural comparison of different antibodies interacting with parvovirus capsids. *J Virol* 2009; 83: 5556-66.

Hammon WD, Enders JF. A virus disease of cats, principally characterized by aleucocytosis, enteric lesions, and the presence of intranuclear inclusion bodies. *J Exp Med* 1939; 69: 327-52.

Hartmann K, Hein J. Feline Panleukopenie. Praxisrelevante Fragen anhand eines Fallbeispiels. *Tierärztl Prax* 2002; 30: 393-9.

Hellard E, Fouchet D, Santin-Janin H, Tarin B, Badol V, Coupier C, Leblanc G, Poulet H, Pontier D. When cats' ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Prev Vet Med* 2011; 101: 250-64.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992; 52: 5391-4.

Hoare CM, DeBouck P, Wiseman A. Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Vaccine* 1997; 15: 273-5.

Hoelzer K, Parrish CR. The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* 2010; 41: 39.

Hoffmann A, Schönborn E, Mergel A, Cußler K. Pharmakovigilanzreport Tierimpfstoffe, Analyse der im Jahr 2008 und 2009 im Paul-Ehrlich-Institut eingegangenen Meldungen. *DTBl* 2010; 6: 766-75.

Hoffmann A, Schwedinger E, Mergel A, Cußler K. Pharmakovigilanzreport Tierimpfstoffe, Analyse der im Jahr 2010 im Paul-Ehrlich-Institut eingegangenen Meldungen. DTBl 2011; 10: 1348-52.

Hoffmann A, Schwedinger E, Werner G, Cussler K. Pharmakovigilanzreport Tierimpfstoffe, Analyse der im Jahr 2011 im Paul-Ehrlich-Institut eingegangenen Meldungen. DTBl 2012; 11: 1554-9.

Hofmann-Lehmann R, Fehr D, Grob M, Elgizoli M, Packer C, Martenson JS, O'Brien SJ, Lutz H. Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3: 554-62.

HogenEsch H, Thompson S, Dunham A, Ceddia M, Hayek M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. Vet Immunol Immunopathol 2004; 97: 77-85.

Holzworth J. Immunology of feline virus diseases. Cornell Vet 1966; 56: 306-15.

Horlacher K, Truyen U, Hartmann K. Feline Panleukopenie - Eine retrospektive Studie [Abstract]. 11. Jahrestagung der Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft München 2002: 108-9.

Horzinek MC, Thiry E. Vaccines and vaccination: the principles and the polemics. J Feline Med Surg 2009; 11: 530-7.

Hueffer K, Parker JS, Weichert WS, Geisel RE, Sgro JY, Parrish CR. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. J Virol 2003; 77: 1718-26.

Hueffer K, Parrish CR. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 392-8.

Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, Takahashi E. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 2000; 278: 13-9.

Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Takahashi E, Mochizuki M. Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 341-6.

Jakel V, Cussler K, Hanschmann KM, Truyen U, König M, Kamphuis E, Duchow K. Vaccination against Feline Panleukopenia: Implications from a field study in kittens. *BMC Vet Res* 2012; 8: 62.

Janeway CA, Travers LJ, Walport M, Shlomchik MJ. The Immune System in Health and Disease. In: *Immunobiology*, 5th edn. Janeway CA, Travers LJ, Walport M, Shlomchik MJ, eds. New York: Garland Science 2001: 412-20.

Jas D, Aeberlé C, Lacombe V, Guiot AL, Poulet H. Onset of immunity in kittens after vaccination with a non-adjuvanted vaccine against feline panleukopenia, feline calicivirus and feline herpesvirus. *Vet J* 2009; 182: 86-93.

Johnson RH. Feline panleukopenia virus. III. Some properties compared to a feline herpesvirus. *Res Vet Sci* 1966; 7: 112.

Johnson RH. Feline panleucopaenia. *Vet Rec* 1969; 84: 338-40.

Johnson RH. Serologic procedures for the study of feline panleukopenia. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: Suppl 2: 876.

Johnson RH, Siegl G, Gautschi M. Characteristics of feline panleucopaenia virus strains enabling definitive classification as parvoviruses. Arch Gesamte Virusforsch 1974; 46: 315-24.

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. J Am Vet Med Assoc 2003; 223: 1283-92.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. Immunology 2006; 119: 254-64.

King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E. Virus taxonomy: Ninth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses 2011: 405-425.

Klotz FW, Gathings WE, Cooper MD. Development and distribution of B lineage cells in the domestic cat: analysis with monoclonal antibodies to cat mu-, gamma-, kappa-, and lambda-chains and heterologous anti-alpha antibodies. J Immunol 1985; 134: 95-100.

Köhler C, Manteufel J, Roeder I, Roesler U, Truyen U. Vergleichende Untersuchungen zur Tenazität verschiedener Modellviren gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln. Hyg Med 2009; 34: 224-32.

Konishi S, Mochizuki M, Ogata M. Studies on feline panleukopenia. I. Isolation and properties of virus strains. Nihon Juigaku Zasshi 1975; 37: 247-57.

Kruse BD, Unterer S, Horlacher K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. J Vet Intern Med 2010; 24: 1271-6.

Kruse BD, Unterer S, Horlacher K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Feline panleukopenia - different course of disease in cats younger versus older than 6 months of age? Tierarztl Prax 2011; 39: 237-42.

Lappin MR, Andrews J, Simpson D, Jensen WA. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. J Am Vet Med Assoc 2002; 220: 38-42.

Lappin MR, Sebring RW, Porter M, Radecki SJ, Veir J. Effects of a single dose of an intranasal feline herpesvirus 1, calicivirus, and panleukopenia vaccine on clinical signs and virus shedding after challenge with virulent feline herpesvirus 1. J Feline Med Surg 2006; 8: 158-63.

Lappin MR, Veir J, Hawley J. Feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus antibody responses in seronegative specific pathogen-free cats after a single administration of two different modified live FVRCP vaccines. J Feline Med Surg 2009; 11: 159-62.

Lappin MR. Feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1 and feline calicivirus antibody responses in seronegative specific pathogen-free kittens after parenteral administration of an inactivated FVRCP vaccine or a modified live FVRCP vaccine. J Feline Med Surg 2012; 14: 161-4.

Larson L, Newbury S, Schultz RD. Canine and feline vaccinations and immunology. In: Infectious Disease Management in Animal Shelters, 1st edn. Miller L, Hurley KF, eds.: Wiley, Blackwell 2009: 61-82.

Lehmann R, von Beust B, Niederer E, Condrau MA, Fierz W, Aubert A, Ackley CD, Cooper MD, Tompkins MB, Lutz H. Immunization-induced decrease of the CD4+:CD8+ ratio in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. Vet Immunol Immunopathol 1992; 35: 199-214.

Lenghaus C, Studdert MJ. Relationships of canine panleucopaenia (enteritis) and myocarditis paroviruses to feline panleucopaenia virus. Aust Vet J 1980; 56: 152-3.

Levy JK, Crawford PC, Lappin MR, Dubovi EJ, Levy MG, Alleman R, Tucker SJ, Clifford EL. Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. J Vet Intern Med 2008; 22: 60-5.

Lombardi M, Pizzarelli F, Righi M, Cerrai T, Dattolo P, Nigrelli S, Michelassi S, Sisca S, Alecci A, Di Geronimo P, et al. Hepatitis B vaccination in dialysis patients and nutritional status. Nephron 1992; 61: 266-8.

Luff PR, Wood GW, Hebert CN, Thornton DH. Canine parvovirus serology: a collaborative assay. Vet Rec 1987; 120: 270-3.

Macartney L, Thompson H, McCandlish IA, Cornwell HJ. Canine parvovirus: interaction between passive immunity and virulent challenge. Vet Rec 1988; 122: 573-6.

MacPherson LW. Feline Enteritis Virus - Its Transmission to Mink Under Natural and Experimental Conditions. Canad J Comp Med & Vet Sci 1956; 20: 197-202.

Mansfield KL, Burr PD, Snodgrass DR, Sayers R, Fooks AR. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. Vet Rec 2004; 154: 423-6.

Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. J Clin Microbiol 2004; 42: 1333-6.

Martella V, Cavalli A, Decaro N, Elia G, Desario C, Campolo M, Bozzo G, Tarsitano E, Buonavoglia C. Immunogenicity of an intranasally administered

modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 1243-5.

McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. J Vet Intern Med 2001; 15: 176-82.

Mochizuki M, Konishi S, Ajiki M, Akaboshi T. Comparison of feline parvovirus subspecific strains using monoclonal antibodies against a feline panleukopenia virus. Nihon Juigaku Zasshi 1989; 51: 264-72.

Mochizuki M, Harasawa R, Nakatani H. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. Vet Microbiol 1993; 38: 1-10.

Mochizuki M, Horiuchi M, Hiragi H, San Gabriel MC, Yasuda N, Uno T. Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. J Clin Microbiol 1996; 34: 2101-5.

Mochizuki M, Ohshima T, Une Y, Yachi A. Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. J Vet Med Sci 2008; 70: 1305-14.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schaetzel H. Parvoviren. In: Molekulare Virologie, 3rd edn. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schaetzel H, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2010: 634-57.

Moore GE, HogenEsch H. Adverse vaccinal events in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2010; 40: 393-407.

Morrison WB, Starr RM. Vaccine-associated feline sarcomas. J Am Vet Med Assoc 2001; 218: 697-702.

Mouzin DE, Lorenzen MJ, Haworth JD, King VL. Duration of serologic response to three viral antigens in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 61-6.

Mueller E. Immunologische Nachweismethoden. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 6th edn. Kraft W, Duerr UM, eds. Stuttgart: Schattauer 2005: 349-51.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Parvoviridae. In: *Veterinary Virology*, 3rd edn. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, eds. San Diego: Academic Press 1999: 343-51.

Nakamura K, Ikeda Y, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mochizuki M. Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses. *Res Vet Sci* 2001a; 71: 219-22.

Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, Sato E, Kawakami K, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T, Mochizuki M. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001b; 8: 663-8.

Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HT, Nguyen NH, Huynh LM, Nguyen LT, Nguyen PN, Nguyen PV, Nguyen NP, Akashi H. A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol* 2004; 149: 2261-9.

Nandi S, Chidri S, Kumar M, Chauhan RS. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Res Vet Sci* 2010; 88: 169-71.

Nara PL, Krakowka S, Powers TE. Effects of prednisolone on the development of immune responses to canine distemper virus in beagle pups. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1742-7.

Neuerer FF, Horlacher K, Truyen U, Hartmann K. Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 247-51.

O'Reilly KJ, Paterson JS, Harriss ST. The persistence in kittens of maternal antibody to feline infectious enteritis (panleucopenia). *Vet Rec* 1969; 84: 376-8.

Ohshima T, Mochizuki M. Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 403-8.

Palermo LM, Hafenstein SL, Parrish CR. Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges. *J Virol* 2006; 80: 8482-92.

Parker JS, Parrish CR. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J Virol* 1997; 71: 9214-22.

Parrish CR, Carmichael LE, Antczak DF. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1982; 72: 267-78.

Parrish CR, Carmichael LE. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. *Virology* 1983; 129: 401-14.

Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 1985; 230: 1046-8.

Parrish CR, Leathers CW, Pearson R, Gorham JR. Comparisons of feline panleukopenia virus, canine parvovirus, raccoon parvovirus, and mink enteritis virus and their pathogenicity for mink and ferrets. *Am J Vet Res* 1987; 48: 1429-35.

Parrish CR, Aquadro CF, Carmichael LE. Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* 1988a; 166: 293-307.

Parrish CR, Burtonboy G, Carmichael LE. Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virology* 1988b; 163: 230-2.

Parrish CR. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 1991; 183: 195-205.

Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* 1991; 65: 6544-52.

Parrish CR. The emergence and evolution of canine parvovirus-an example of recent host range mutation. *Semin Virol* 1994; 5: 121-32.

Patterson EV, Reese MJ, Tucker SJ, Dubovi EJ, Crawford PC, Levy JK. Effect of vaccination on parvovirus antigen testing in kittens. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 359-63.

Paul-Ehrlich-Institut. Katzenimpfstoffe. 2013:
<http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/katzen/katzen-alle-table.html?nn=3263662>.

Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2000; 75: 127-33.

Perez R, Francia L, Romero V, Maya L, Lopez I, Hernandez M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* 2007; 124: 147-52.

Pesanti EL. Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 813-32.

Pollock RV, Carmichael LE. Dog response to inactivated canine parvovirus and feline panleukopenia virus vaccines. *Cornell Vet* 1982; 72: 16-35.

Pollock RV, Postorino NC. Feline panleukopenia and other enteric viral diseases. In: *The Cat: Diseases and Clinical Management*, 2nd edn. Sherding RG, ed. New York: Churchill Livingstone 1994: 479-87.

Polzin D, Lund E, Walter P, Klausner J. From journal to medicine: evidence based medicine. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy*, 8th edn. Bonagura J, ed. Philadelphia: Saunders 1999: 2-8.

Poole GM. Stability of a modified, live panleukopenia virus stored in liquid phase. *Appl Microbiol* 1972; 24: 663-4.

Poulet H. Alternative early life vaccination programs for companion animals. *J Comp Pathol* 2007; 137 Suppl 1: S67-71.

Povey RC, Koonse H, Hays MB. Immunogenicity and safety of an inactivated vaccine for the prevention of rhinotracheitis, caliciviral disease, and panleukopenia in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 177: 347-50.

Reed AP, Jones EV, Miller TJ. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* 1988; 62: 266-76.

Reese MJ, Patterson EV, Tucker SJ, Dubovi EJ, Davis RD, Crawford PC, Levy JK. Effects of anesthesia and surgery on serologic responses to vaccination in kittens. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 116-21.

Reif JS. Seasonality, natality and herd immunity in feline panleukopenia. *Am J Epidemiol* 1976; 103: 81-7.

Reubel GH, Dean GA, George JW, Barlough JE, Pedersen NC. Effects of incidental infections and immune activation on disease progression in experimentally feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7: 1003-15.

Richards J, Rodan I. 2000 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 47-72.

Richards JR, Elston TH, Ford RB, Gaskell RM, Hartmann K, Hurley KF, Lappin MR, Levy JK, Rodan I, Scherk M, Schultz RD, Sparkes AH. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel report. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229: 1405-41.

Riser WH. Infectious panleukopenia of cats. *North Am Vet* 1943; 24: 293-8.

Saalmuller A. New understanding of immunological mechanisms. *Vet Microbiol* 2006; 117: 32-8.

Sagazio P, Tempesta M, Buonavoglia D, Cirone F, Buonavoglia C. Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J Virol Methods* 1998; 73: 197-200.

Schultz RD, Scott FW. Canine and feline immunization. *Vet Clin North Am* 1978; 8: 755-68.

Schultz RD, Ford RB, Olsen J. Titer testing and vaccination: A new look at traditional practices. *Vet Med* 2002; 97: 1-13.

Schultz RD. Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Vet Microbiol* 2006; 117: 75-9.

Schultze AE, Frank LA, Hahn KA. Repeated physical and cytologic characterizations of subcutaneous postvaccinal reactions in cats. *Am J Vet Res* 1997; 58: 719-24.

Scott FW. Feline Panleukopenia. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, New York 1968.

Scott FW, Csiza CK, Gillespie JH. Feline viruses. V. Serum-neutralization test for feline panleukopenia. *Cornell Vet* 1970a; 60: 183-91.

Scott FW, Csiza CK, Gillespie JH. Feline viruses. IV. Isolation and characterization of feline panleukopenia virus in tissue culture and comparison of cytopathogenicity with feline picornavirus, herpesvirus, and reovirus. *Cornell Vet* 1970b; 60: 165-82.

Scott FW, Csiza CK, Gillespie JH. Maternally derived immunity to feline panleukopenia. *J Am Vet Med Assoc* 1970c; 156: 439-53.

Scott FW. Comments on feline panleukopenia biologics. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: Suppl 2:910-5.

Scott FW, Gillespie JH. Immunization for feline panleukopenia. *Vet Clin North Am* 1971; 1: 231-40.

Scott FW. Viral Diseases. Panleukopenia. In: *Diseases of the Cat: Medicine and Surgery*, 1st edn. Holzworth J, ed. Philadelphia: WB Saunders 1987: 182-93.

Scott FW, Geissinger CM. Duration of immunity in cats vaccinated with an inactivated feline panleukopenia, herpesvirus, and calicivirus vaccine. *Feline Pract* 1997; 25: 12-9.

Scott FW, Geissinger CM. Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *Am J Vet Res* 1999; 60: 652-8.

Senda M, Hirayama N, Itoh O, Yamamoto H. Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *J Gen Virol* 1988; 69: 349-54.

Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 1985; 23: 61-73.

Srivastav A, Kass PH, McGill LD, Farver TB, Kent MS. Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 595-602.

Ständige Impfkommision Vet. Leitlinie zur Impfung von Kleintieren. *DTBl* 2013; 7.

Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. Parvovirus infections in wild carnivores. *J Wildl Dis* 2001; 37: 594-607.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.

Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Prevalence of antibodies to four major canine viral diseases in a Liverpool hospital population. *J Small Anim Pract* 1991; 32: 175-9.

Tizard I, Ni Y. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 54-60.

Tizard IR. Helper T cells and their response to antigen. In: *Veterinary Immunology*, 9th edn. Tizard IR, ed. Philadelphia: W.B. Saunders 2012a: 137-49.

Tizard IR. B cells and their Response to Antigen. In: Veterinary Immunology, 9th edn. Tizard IR, ed. Philadelphia: W.B. Saunders 2012b: 150-64.

Tizard IR. Immunity in the Fetus and Newborn. In: Veterinary Immunology, 9th edn. Tizard IR, ed. St. Louis: Saunders 2012c: 225-39.

Tizard IR. Vaccines and their Production. In: Veterinary Immunology, 9th edn. Tizard IR, ed. St. Louis: W.B. Saunders 2012d: 258-71.

Tizard IR. The Use of Vaccines. In: Veterinary Immunology, 9th edn. Tizard IR, ed. St. Louis: W.B. Saunders 2012e: 272-82.

Tizard IR. Immunity to Viruses. In: Veterinary Immunology, 9th edn. Tizard IR, ed. St. Louis: Saunders 2012f: 296-310.

Tizard IR. Drugs and other Agents that affect the Immune System. In: Veterinary Immunology, 9th edn. Tizard IR, ed. St. Louis: Saunders 2012g: 467-76.

Tratschin JD, McMaster GK, Kronauer G, Siegl G. Canine parvovirus: relationship to wild-type and vaccine strains of feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. J Gen Virol 1982; 61: 33-41.

Truyen U, Parrish CR. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. J Virol 1992; 66: 5399-408.

Truyen U, Agbandje M, Parrish CR. Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. Virology 1994; 200: 494-503.

Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish CR. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. J Virol 1995; 69: 4702-10.

Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 1996a; 215: 186-9.

Truyen U, Platzer G, Parrish CR. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet Rec* 1996b; 138: 365-6.

Truyen U. Canine Parvoviren in Deutschland: Ein Update. 22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Bad Nauheim 1997: 204-8.

Truyen U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 1999; 69: 47-50.

Truyen U, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 1: 538-46.

Truyen U. Feline Panleukopenie – warum ist sie immer noch so häufig? AfT-Herbstsymposium, München 2010: 5.

Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith TJ, Rossmann MG, Compans RW. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 1991; 251: 1456-64.

Url A, Truyen U, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Schmidt P. Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3801-5.

Uttenthal A, Lund E, Hansen M. Mink enteritis parvovirus. Stability of virus kept under outdoor conditions. *APMIS* 1999; 107: 353-8.

Vahlenkamp TW. Immunologie bei der Katze - was passiert nach einer Infektion oder Impfung? AfT-Herbstsymposium, München 2010: 32-4.

Verge J, Crisoforoni N. La gastroenterite infectieuse des chats est elle due à un virus filtrable? C R Soc Biol 1928; 99: 312-4.

Walker ST, Feilen CP, Sabine M, Love DN, Jones RF. A serological survey of canine parvovirus infection in New South Wales, Australia. Vet Rec 1980; 106: 324-5.

Waner T, Mazar S, Keren-Kornblatt E. Application of a dot enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of the immune status to canine parvovirus and distemper virus in adult dogs before revaccination. J Vet Diagn Invest 2006; 18: 267-70.

Wang HC, Chen WD, Lin SL, Chan JP, Wong ML. Phylogenetic analysis of canine parvovirus VP2 gene in Taiwan. Virus genes 2005; 31: 171-4.

Wilhelm S, Loewenstein M, Truyen U. Untersuchung eines Schnelltests zur Bestimmung von Parvovirus Antikörpern in der Kleintierpraxis. Prakt Tierarzt 2005; 86:10: 710-7.

IX. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Überlassung dieses interessanten Themas und die damit verbundene Möglichkeit an der Medizinischen Kleintierklinik zu arbeiten und zu lernen. Ich danke ihr insbesondere für ihre Motivation, unzählige Korrekturen der Publikationen, Abstracts und Vorträge. Sie ermöglichte mir, die Studien auf dem ECVIM 2013 zu präsentieren und hatte jederzeit Vertrauen in meine Arbeit. Frau Dr. Bianca Stützer danke ich sehr für ihre jederzeit gewährte schnelle und kompetente Unterstützung bei allen kleinen und großen Fragen und Problemen. Außerdem danke ich ihr für das Korrekturlesen der Arbeit. Herrn Prof. Dr. Ralf S. Müller und Frau Dr. Carola Sauter-Louis danke ich für ihre Beratung bei der statistischen Auswertung. Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen danke ich für die gute Zusammenarbeit und seine Hilfe beim Studiendesign. Herrn Dr. Timo Homeier danke ich für den fachlichen Austausch in Leipzig. Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg danke ich dafür, dass sie die Proben der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik zur Verfügung gestellt hat. Ein Dank geht auch an die Mitarbeiterinnen des Labors der Medizinischen Kleintierklinik für ihre Unterstützung beim Sammeln der Proben. Nadja danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Verarbeitung der Proben und die Einarbeitung in die Methodik des Hämagglutinationshemmtests sowie für ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung von über 350 Tests. Allen Patientenbesitzern möchte ich für unzählige Telefonate und das gewissenhafte Ausfüllen der Fragebögen danken. Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen der Medizinischen Kleintierklinik für zwei lehrreiche, spannende und unvergessliche Jahre. Meiner Mutter Margrit und meinem Bruder Tim danke ich sehr für ihren Rückhalt und ihren Glauben an mich, sowie für viele aufmunternde Gespräche. Zu guter Letzt danke ich Dir, Thilo, für Deine unermüdliche Unterstützung in allen Bereichen dieser Arbeit, unzählige Diskussionen über Studiendesign und Statistik und für zwei tolle Jahre in München. Dir und Anton danke ich sehr für die Zerstreuung in der Endphase.